

Fragment-basierte Leitstruktursuche am Beispiel der Proteinkinase A

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von

Matthias Oebbeke

aus

Steinheim (Westfalen)

Marburg/Lahn 2021

Erstgutachter Prof. Dr. Gerhard Klebe
 Institut für Pharmazeutische Chemie
 Philipps-Universität Marburg

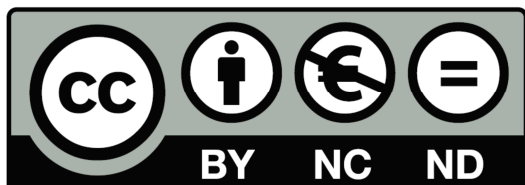
Zweitgutachter Prof. Dr. Andreas Heine
 Institut für Pharmazeutische Chemie
 Philipps-Universität Marburg

Eingereicht am 26.01.2021

Tag der mündlichen Prüfung am 26.03.2021

Hochschulkennziffer 1180

Die in dieser Arbeit verfassten Untersuchungen wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Juli 2017 bis November 2020 durchgeführt.



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Einheiten, Variablen und Konstanten	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Fragment-basierte Leitstruktursuche und Design	1
1.2 Die wichtige Rolle der Thermodynamik	3
1.2.1 Allgemeines.....	3
1.2.2 ITC – Isotherme Titrationskalorimetrie.....	4
1.3 Die Proteinkinase A als Modellenzym	7
1.3.1 Allgemeines.....	7
1.3.2 Aufbau, Aktivierung und Mechanismus der PKA.....	8
1.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	12
1.5 Fluoreszenz-basierte Aktivitätsmessungen.....	14
1.6 Strukturuntersuchung an Proteinkristallen.....	16
1.6.1 Kristallisation.....	16
1.6.2 Kristallographie	18
1.7 Zielsetzung.....	19
2. Fragment-Bindung an die Kinase-Scharnier-Region: Wenn Ladungsverteilung und lokale pK_a - Verschiebungen etablierte Bioisosterie-Konzepte fehlleiten	21
2.1 Einleitende Bemerkungen	21
2.2 Einleitung.....	21
2.3 Ergebnisse und Diskussion	25
2.4 Fazit	34
2.5 Detaillierte Beschreibung der Strukturen	35

2.6	Proteindatenbank-Analyse	43
2.7	Experimentelle Durchführung.....	44
3.	Zwei Methoden, ein Ziel: Strukturelle Unterschiede zwischen Kokristallisation und Kristall- <i>Soaking</i> zur Findung von Ligand-Bindungsposes	47
3.1	Einleitende Bemerkungen.....	47
3.2	Einleitung	47
3.3	Ergebnisse	50
3.4	Diskussion.....	59
3.5	Fazit	66
3.6	Experimentelle Durchführung.....	67
3.6.1	Kristallisation	67
3.6.2	Überlagerung der Strukturen und RMSD-Analyse.....	68
4.	Frühzeitige Erkennung von kristallographischen Hits mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	69
4.1	Einleitende Bemerkungen.....	69
4.2	Einleitung	69
4.3	Ergebnisse und Diskussion	73
4.4	Experimentelle Durchführung.....	81
5.	Bindungscharakterisierung von Fragmenten basierend auf dem Wirkstoff Fasudil und dem natürlichen Substrat ATP an der Proteinkinase A	85
5.1	Einleitende Bemerkungen.....	85
5.2	Einleitung	85
5.3	Ergebnisse	87
5.3.1	Isotherme Titrationskalorimetrie	87
5.3.2	Kristallographie.....	90
5.3.3	Bestimmung der Reinheit von Liganden mittels qNMR	95

5.4	Auswertung und Diskussion	95
5.4.1	Auswirkung des Puffersystems auf die thermodynamischen Parameter	95
5.4.2	Kristallographische Betrachtung der PKA-Ligand-Bindungen.....	97
5.4.3	Auswertung der thermodynamischen Bindungsparameter und Vergleich mit den kristallographischen Ergebnissen	106
5.5	Fazit	110
5.6	Experimentelle Durchführung.....	113
5.6.1	Bestimmung der Rotationswinkel verschiedener Bindeposen.....	113
5.6.2	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	114
6.	Untersuchungen von Folgeverbindungen initialer <i>in silico</i> Hits basierend auf einer Naturstoff-Bibliothek	117
6.1	Einleitende Bemerkungen	117
6.2	Einleitung.....	117
6.3	Ergebnisse	118
6.4	Auswertung und Diskussion	122
6.5	Fazit	128
6.6	Experimentelle Durchführung.....	129
7.	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign mit Phenol als Sonde.....	133
7.1	Einleitende Bemerkung	133
7.2	Einleitung.....	133
7.3	Ergebnisse	136
7.4	Diskussion und Fazit	144
7.5	Experimentelle Durchführung.....	148
	Zusammenfassung	151
	Summary	155

8.	Experimenteller Teil	159
8.1	Expression und Aufreinigung	159
8.2	Kristallisation und Strukturbestimmung	163
9.	Anhang.....	169
9.1	Kristallographische Tabellen	169
9.2	Elektronendichte der Liganden	176
9.3	RMSD-Werte	182
9.4	Thermodynamische Daten	183
	Literaturverzeichnis	189
	Abbildungsverzeichnis	197
	Danksagung.....	201
	Eidesstattliche Erklärung	205
	Lebenslauf.....	207

Abkürzungsverzeichnis

ADP/ATP	Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat
B-Faktor	Temperatur-Faktor in der Röntgenkristallographie
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BRIJ-35	Polyethylenglycollaurylether
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	engl. <i>chinese hamster ovary</i> , deutsch: Ovarien des chinesischen Zwerghamsters
demin.	demineralisiert
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DFG-Motiv	Motiv der Proteinkinase A mit den Aminosäuren Asp186-Phe187-Gly188
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	Kolibakterium (lat. <i>Escherichia coli</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESRF	engl. <i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
EV	Emissionsverhältnis
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
GDP, GTP	Guanosindiphosphat, Guanosintriphosphat
Gly-Schleife	Glycin-reiche Schleife
GPCR	engl. <i>G-protein coupled receptor</i> , G-Protein gekoppelter Rezeptor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTS	engl. <i>high-throughput screening</i> , Hochdurchsatz-Musterung
ID	Identifikationsnummer der Liganden
I-Effekt	Induktiver Effekt

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	engl. <i>isothermal titration calorimetry</i> , Isotherme Titrationskalorimetrie
Laser	engl. <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
Lyck	Lymphozyten-spezifische Kinase
MAD	Multiple anomale Dispersion
MBT	MES-Bis-Tris
Mega8	N-Octanoyl-N-methylglucamin
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MPD	2-Methylpentan-2,4-diol
PDB	Protein-Datenbank
PfGST	Glutathion-S-Transferase des Malariaparasiten <i>Plasmodium falciparum</i>
PKA	katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A
PKI	peptidischer Inhibitor der PKA
RMSD	engl. <i>root mean square deviation</i>
SPR	engl. <i>surface plasmon resonance spectroscopy</i> , Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
TEA	Triethanolamin
TEV	engl. <i>tobacco etch virus</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett

Einheiten, Variablen und Konstanten

%P	Phosphorylierungsgrad in Prozent
Å	Angström
c (A)	Konzentration an A
C _{0%/100%}	Emission von Coumarin für die 0%/100% Phosphorylierungskontrolle
ΔX	Änderung von X
F _{0%/100%}	Emission von Fluorescein für die 0%/100% Phosphorylierungskontrolle
F _c	kalkulierte Reflexionsamplitude
F _o	beobachtete Reflexionsamplitude
g	Ligandeneffizienz
G	Freie GIBBSsche Enthalpie
h	Stunde
H	Enthalpie
I	Intensität
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
J	Joule
K	Kelvin
K _B	Bindungskonstante
K _{i/D}	Dissoziationskonstante
K _m	Michaelis-Menten Konstante
m	Masse
M	Molarität in mol/L
M	Molekulargewicht in g/mol
min	Minute
n	Nano
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , deutsch Molekulargewichtsgrenze
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante

R_f	freier R-Wert
$R(I)_{Sym}$	$\sum_h \hat{I}_h - I_{h,i} / \sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}$ mit $\hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$ und \hat{I}_h als Mittel von der Intensität $I_{h,i}$ der beobachteten Reflektionen h .
S	Entropie
<i>spez. EE</i>	spezifischer enthalpischer Effizienzwert
T	Temperatur auf der absoluten Kelvin-Skala
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V	Volumen

1. Einleitung

In dieser Arbeit wurden neue Ansätze und Hilfsmittel für das Wirkstoffdesign unter Zuhilfenahme bestehender Methoden getestet und angepasst. Ein neues Hilfsmittel zur Identifizierung von Ligandbindungen an ein Protein wurde in Abschnitt 4 mittels Fluoreszenzänderungen eines Proteinkristalls untersucht. Weiterhin wurden Fragmentserien thermodynamisch und kristallographisch auf ihre Bindungseigenschaften an der Proteinkinase A untersucht. Die verschiedenen Fragestellungen sollen in den nachfolgenden Kapiteln erläutert werden. Im Allgemeinen beziehen sich die Aufgabenstellungen auf die detaillierte Betrachtung von Bindungsänderungen kleiner Fragmente, welche in ihrer chemischen Struktur nur geringfügige Unterschiede aufweisen. Darüber hinaus wurden Bindungseigenschaften von größeren Liganden untersucht und mit denen der Fragmente verglichen. Zwei Projekte (**Kapitel 6 und 7**) betrachten größere Liganden, welche aus Fragmenten erweitert wurden. Die Proteinkinase A wurde in dieser Arbeit als Modellenzym verwendet, da diese sehr gut untersucht ist.

1.1 Fragment-basierte Leitstruktursuche und Design

Die Fragment-basierte Leitstruktursuche ist ein Begriff aus dem Themengebiet des Wirkstoffdesigns und ist ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Wirkstoffe.^[1] Fragment-basierte Leitstrukturen bieten Wissenschaftlern einen Startpunkt in der Entwicklung geeigneter Kandidaten für ein Arzneimittel und sind eine Alternative zu konventionellen *Screening*-Methoden.^[2] Bei Letzteren geht die industrielle Pharmaforschung seit einigen Jahren dazu über diverse Verbindungen zu testen und aus diesen passende Leitstrukturen abzuleiten. Ein in der Industrie genutztes Verfahren ist das Hochdurchsatz-*Screening* (engl. *HTS*, **High-Troughput Screening**).^[3] Bei dem *HTS*-Verfahren werden meistens Substanzen mit mikromolarer Affinität gefunden, welche in dem Schritt der Optimierung (Wirkstoffdesign) auf ein *Target* angepasst werden. Diese aus dem *HTS* kommenden Ausgangsverbindungen werden durch Dekorierungen an ihrem Grundgerüst schnell zu größeren Molekülen, welche nicht den für Wirkstoff geltenden LIPINSKI-Regeln folgen. Diese Regeln stellen Anhaltspunkte für die Suche nach geeigneten Wirkstoffen dar und beinhalten, dass sie als Molekulargewicht nicht mehr als 500 g/mol sowie einen *clogP* von maximal fünf aufweisen sollten.

Weiterhin sollten Wirkstoffe nicht mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren beinhalten.^[4] Alle diese Eigenschaften beeinflussen die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs und sollten daher nicht überschritten werden. Um das zu verhindern ist der Startpunkt im Prozess des Wirkstoffdesigns von entscheidender Bedeutung.^[2] Daher wird nach kleinen, als Fragmente bezeichneten Startmolekülen gesucht, welche zum Zielprotein optimal gerichtete Wechselwirkungsmuster ausbilden. Ziel ist es, Wirkstoffe zu entwickeln, welche mit hoher Affinität (hohe Wirkung) und Selektivität (wenig Nebenwirkungen) an ihr Zielprotein binden.^[5]

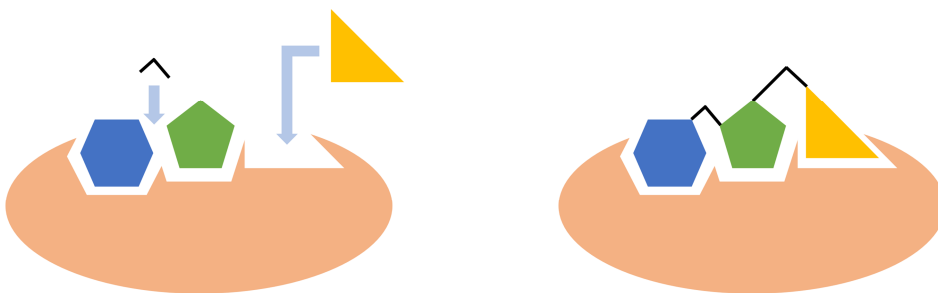


Abbildung 1.1: Prinzip des Fragment-basierten Wirkstoffdesigns. Das Protein (beige) besitzt in den meisten Fällen ein aktives Zentrum mit Bindetaschen (farblose Formen). An diese werden Fragmente (farbige Formen) angepasst und mithilfe geeigneter Linker (schwarz) zu einem großen Molekül mit hoher Affinität zum Zielprotein zusammengefügt.

Ausgewählte Fragmente bieten aufgrund der gerichteten Wechselwirkungen zu ihrem *Target* die Möglichkeit zu Wirkstoffen mit nanomolarer Affinität modifiziert zu werden und dabei hochselektiv an diese zu binden. Hierfür können ihnen im Zuge des Wirkstoffdesigns gezielt Seitenketten hinzugefügt werden, ohne dabei die LIPINSKI-Regeln zu verletzen. Dieses ist ein Vorteil gegenüber den meisten *HTS-Hits*.^[2,6]

1.2 Die wichtige Rolle der Thermodynamik

1.2.1 Allgemeines

Im vorherigen Abschnitt (siehe **Abschnitt 1.1**) wurde die Relevanz der zielgerichteten Wechselwirkungen eines Wirkstoffs zu seinem Zielprotein beschrieben. In diesem Zusammenhang ist auch die Bedeutsamkeit der Thermodynamik zu nennen.

Für chemische Reaktionen, Bindungsevents (z.B. Enzym-Substrat-Wechselwirkungen) und auch als physikalische Fundamentalgleichung gilt der thermodynamische Zusammenhang:^[7]

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.1)$$

Dieser beschreibt die Änderung der freien GIBB'schen Enthalpie (ΔG) und setzt sich aus den Änderungen der Enthalpie (ΔH) und der Entropie (ΔS) bei einer bestimmten Temperatur (T) zusammen. Bezogen auf das in dieser Arbeit grundlegende Thema, der Bindung von Liganden an ein Protein, ist die freie GIBB'sche Enthalpie als Bindungsenthalpie zu verstehen.^[8] Aus **Gleichung 1.1** wird deutlich, dass die Bindung eines Liganden an ein Zielprotein aus einem enthalpischen und einem entropischen Beitrag besteht. Aus aktueller Sicht der Wirkstoffforschung ist der Fokus auf Liganden mit enthalpisch favorisierten Bindungsenergien und zielgerichteten Wechselwirkungen zu legen. Diese beiden Aspekte scheinen in engem Zusammenhang zu stehen.^[5] Dabei darf der entropische Bindungsbeitrag nicht unterschätzt werden, da dieser die Gesamtbilanz ΔG negativ beeinflussen kann. Allgemein ist eine Bindung umso favorisierter desto größer der negative Betrag ist. Dies bedeutet, dass bei $\Delta G < 0$ eine Bindung (oder chemische Reaktion) freiwillig erfolgt.^[9]

Die Thermodynamik gibt neben den detaillierten Darstellungen des enthalpischen und entropischen Bindungsbeitrags auch eine sehr gute Auskunft über die Affinität eines neuen Wirkstoffs. Allerdings spielen für die Wirksamkeit noch viele weitere Faktoren wie die Kinetik, Bioverfügbarkeit und die tatsächliche Wirkung auf den Menschen eine Rolle. Dennoch sollte einer der ersten Schritte zur Findung neuer Wirkstoffkandidaten die Bestimmung der thermodynamischen Parameter sein. Hierfür

kann die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC – engl. *Isothermal Titration Calorimetry*) angewendet werden.

1.2.2 ITC – Isotherme Titrationskalorimetrie

Ein isothermes Titrationskalorimeter setzt sich aus zwei, in **Abbildung 1.2** schematisch dargestellten, identischen Zellen zusammen. Diese bestehen aus sehr wärmeleitfähigem Material und sind von einem adiabatischen Mantel umschlossen.^[10]

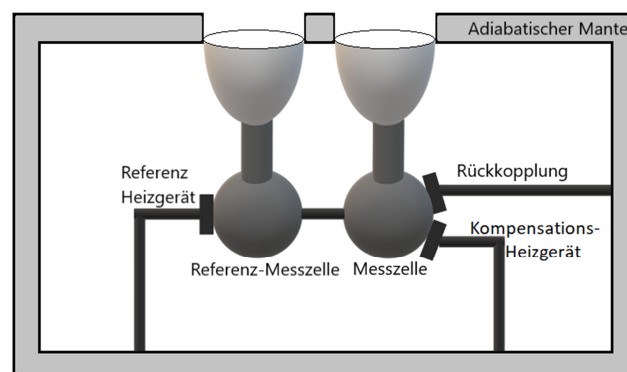


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeters. Abbildung nach PIERCE et al.^[10]. Ein isothermes Titrationskalorimeter besteht aus zwei identischen Zellen. Beide Zellen sind miteinander gekoppelt und können mithilfe von Sensoren und Heizgeräten auf konstanter Temperatur gehalten werden. Ein adiabatischer Mantel verhindert Wärmeverluste nach außen und sorgt für identische Bedingungen beider Zellen.

Die Referenz- und Probenzelle sind miteinander verbunden und tauschen Temperaturänderungen über Sensoren aus. Die Referenzzelle wird kontinuierlich auf einer festgelegten Temperatur gehalten, sodass Unterschiede zur Probenzelle direkt gemessen werden.^[10] Das gesamte System ist an eine Auswerteeinheit angeschlossen, sodass diese geringen Wärmeänderungen simultan mithilfe einer geeigneten Software registriert und ausgewertet werden. Hervorgerufen werden Temperaturänderungen zwischen beiden Zellen durch die Zugabe von Probelösung in die Probenzelle. Eine festinstallierte Spritze titriert diese Lösung hinein und sorgt durch Rotation für eine schnelle Verteilung innerhalb der gesamten Zelle. Standardmäßig wird eine Proteinlösung vorgelegt und eine

Ligand-enthaltene Lösung titriert.^[11] Da bei diesem Vorgang Wärmeenergie freigesetzt oder aufgenommen wird, wärmt sich die Probenzelle auf oder kühlt ab. Dieser Unterschied wird schnellstmöglich von dem System ausgeglichen bevor eine erneute Injektion stattfindet. Der Wärmebeitrag ist eine Mittelung der Beiträge aus gebrochenen und aufgebauten Wasserstoffbrückenbindungen (inklusive des Ablösens der Solvationshülle des Liganden) sowie elektrostatischen, Dipol-Dipol, hydrophoben und van-der-Waals Wechselwirkungen.^[12]

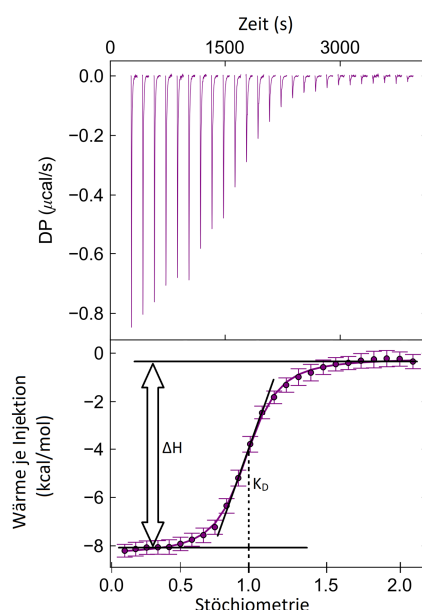


Abbildung 1.3: Thermogramm der Rohdaten aus einer ITC-Messung. Aufgetragen sind die Wärmemengen pro Zeit gegen die Zeit. Die hier gezeigten Signale entsprechen jeweils der freiwerdenden Wärmemenge nach einer Injektion (exothermer Verlauf). Unten ist das ausgewertete Thermogramm gezeigt, welches aus der Auftragung der Wärmemenge pro Mol gegen die Stöchiometrie besteht.

Mit jeder Injektion binden weniger Ligandmoleküle an das Protein und die Wärmemenge nimmt ab (siehe **Abbildung 1.3** oben). Der Grund liegt darin, dass mit fortschreitender Messung immer mehr Proteinmoleküle abgesättigt vorliegen und den weiter hinzugegebenen Liganden nicht zur Verfügung stehen. Daher ergibt sich wie in **Abbildung 1.3** ein sigmoidaler Kurvenverlauf der integrierten Wärmesignale,^[13] welche gegen das stöchiometrische Verhältnis von Ligand zu Protein aufgetragen werden. Im Wendepunkt beträgt diese idealerweise eins, da bei einer 1:1-Bindungsstöchiometrie

gleich viele Ligand- und Proteinmoleküle vorliegen. Außerdem kann aus der Steigung am Wendepunkt die Bindungskonstante K_B abgelesen werden.^[14] Mit dieser lässt sich bei bekannter Temperatur und Einbeziehung der allgemeinen Gaskonstante R die Änderung der freien GIBBS Enthalpie nach folgender Gleichung berechnen:^[15]

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_B \quad (1.2)$$

Weiterhin ergibt sich die Änderung der Enthalpie – wie in **Abbildung 1.3** unten gezeigt – aus der Differenz der anfänglichen und finalen Wärmesignale. Über den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Zusammenhang

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.1)$$

kann der entropische Beitrag aufgrund der Kenntnis von ΔG , ΔH und der absoluten Temperatur bestimmt werden.

Neben den thermodynamischen Parametern wird oft die Dissoziationskonstante K_D als Parameter herangezogen. Diese ergibt sich aus der Bindungskonstante, da sie mathematisch in einem inversen Verhältnis zueinanderstehen.^[15] Beide Konstanten sind aus dem Massenwirkungsgesetz ableitbar und beschreiben die Lage einer Gleichgewichtsreaktion. Im Fall von Protein-Ligand-Wechselwirkungen ergeben diese Konstanten eine Aussage über die Affinität eines Liganden zu seinem Zielprotein.

Ein Problem bei der Vermessung von kleinen Molekülen, wie Fragmenten ist ihre geringe Affinität zu Zielproteinen. Ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche ITC-Messung ist der WISEMAN c-Wert.^[16] Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis von Proteinkonzentration zu K_D -Wert des zu vermessenden Liganden.^[16] Für schwach bindende Liganden muss daher die Proteinkonzentration erhöht werden. Der Hintergrund sind die – mit Ausnahme von entropisch sehr ungünstigen Bindern – geringen Wärmesignale bei Messungen mit schwach affinen Liganden, welche zu große Messfehler hervorrufen. Durch den c-Wert lassen sich daher Abschätzungen über die Verlässlichkeit der Messung machen. In der Praxis können jedoch nicht beliebig hohe Proteinkonzentrationen verwendet werden, wodurch

sich ein Limit der Messbarkeit von Liganden mit einem K_D von etwa 1 mM ergibt.^[17] Um dieses Problem zu umgehen können die thermodynamischen Profile von schwächer bindenden Liganden mithilfe von Verdrängungstitrationen bestimmt werden. Hierfür wird das Protein mit dem zu vermessenden Liganden abgesättigt und eine Verdrängungstitration mit einem Referenzliganden durchgeführt. Die erhaltenen thermodynamischen Parameter des Referenzliganden sind durch die vorherige Zugabe des zu untersuchenden Liganden verändert. Aus dieser Änderung werden die thermodynamischen Parameter für den verdrängten Liganden nach folgenden Gleichungen ermittelt:^[12]

$$K_{Lig} = \left(\frac{K_{Ref}}{K_{obs}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{L_{Lig,tot}} \quad (1.3)$$

$$\Delta H_{Lig} = (\Delta H_{Ref} \cdot \Delta H_{obs}) \cdot \left(1 + \frac{1}{K_{Lig} \cdot L_{Lig,tot}} \right) \quad (1.4)$$

Gleichung 1.3 beinhaltet jeweils die Bindungskonstanten für den Referenzliganden (K_{Ref}), des zu untersuchenden Liganden (K_{Lig}) mit der Konzentration dieses Liganden ($L_{Lig,tot}$) und den Wert aus der Verdrängungsmessung (K_{obs}). Für die Dissoziationskonstante muss der inverse, ermittelte Wert verwendet werden. Der enthalpische Bindungsbeitrag des zu untersuchenden Liganden (ΔH_{Lig}) wird mit **Gleichung 1.4** und der Kenntnis des enthalpischen Beitrags aus der Referenzmessung (ΔH_{Ref}), sowie aus der Verdrängungsmessung (ΔH_{obs}) bestimmt. Somit lassen sich ΔG_{Lig} und der entropische Beitrag $-T\Delta S_{Lig}$ mithilfe von **Gleichung 1.1** und **1.2** ermitteln.

1.3 Die Proteinkinase A als Modellenzym

1.3.1 Allgemeines

Da die Proteinkinase A (PKA) sehr gut untersucht ist und als Modell für die gesamte Familie der Kinasen dient, wird sie in dieser Arbeit als Modellenzym verwendet. Die hier verwendete PKA stammt aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*, UniProt accession code: P25321^[18], CHO) und unterscheidet sich von der humanen PKA mit einer Sequenzidentität von 98,3% nur geringfügig.^[18,19]

Im menschlichen Körper spielen Enzyme eine entscheidende Rolle, indem sie die physiologischen Reaktionen bei Körpertemperatur ermöglichen. Kinasen übertragen Phosphatgruppen auf andere Proteine und können dadurch eine Konformationsänderung bewirken, welche die Aktivität der betreffenden Proteine beeinflusst.^[20] Die Relevanz von Kinasen verdeutlicht sich unter dem Aspekt, dass etwa ein Drittel aller Proteine in Zellen von Säugetieren phosphoryliert vorliegen.^[20] Dabei stellen die Kinasen einen Anteil von 10% aller menschlichen Zielproteine dar. Derzeit entfalten 3% aller für die Therapie entwickelten Kleinmolekül-Wirkstoffe ihre Wirkung an Kinasen.^[21]

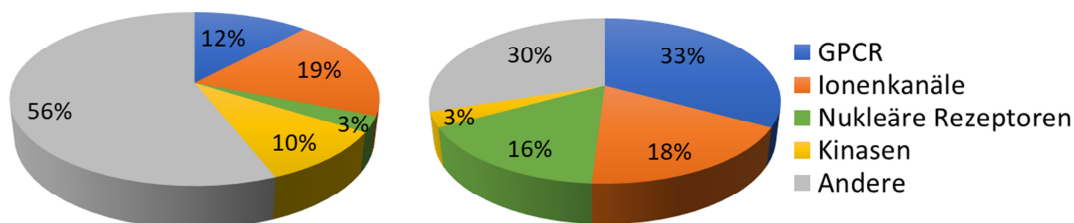


Abbildung 1.4: Verteilung von Wirkstoffzielen. Links ist die Verteilung der menschlichen „Drug Targets“ nach ihren Proteinfamilien gezeigt. Die Grafik rechts zeigt die tatsächlich adressierten Proteinfamilien von auf dem Markt befindlichen Wirkstoffen. Die Abbildung wurde nach SANTOS et al. erstellt.^[21]

Die Fehlregulierung von Kinasen kann ein breites Spektrum an Krankheiten auslösen.^[22] Darunter zählen Gefäßkrankheiten, Entzündungen, neurologische Störungen oder Krebs.^[22,23] Ein Problem bei der Inhibition von Kinasen stellt jedoch die oftmals schlechte Selektivität der Wirkstoffe dar, sodass viele Nebenwirkungen auftreten können. Daher werden einige dieser Wirkstoffe wieder vom Markt genommen, oder gar nicht erst zugelassen.^[21]

1.3.2 Aufbau, Aktivierung und Mechanismus der PKA

Physiologisch ist die Proteinkinase A im menschlichen Körper vor allem in der Signaltransduktion ein wichtiges Protein. Bei diesem Vorgang werden extrazelluläre Signale in das Innere von Zellen übertragen. Der für die PKA relevante, über cAMP vermittelte Weg beginnt mit dem Andocken eines

Hormons an ein G-Protein gekoppelten Rezeptor (engl. GPCR - **G-protein-coupled receptor**).^[24] Diese Bindung im extrazellulären Raum induziert eine Konformationsänderung, welche den Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins bewirkt. Das G-Protein spaltet sich in zwei Teile und die aktivierte α -Untereinheit lagert sich an die Adenylatzyklase an. Diese ist nun aktiv und stellt aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches AMP (cAMP) her. Letzterer wird als sekundärer Botenstoff bezeichnet. Der dadurch erhöhte cAMP-Spiegel bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase A.^[24,25] Diese liegt zunächst inaktiv als Komplex aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten vor. Vier Moleküle cAMP lagern sich an die regulatorischen Untereinheiten an und setzen die katalytischen als Monomere frei.^[26] Letztere können weitere Proteine aktivieren und somit verschiedene Zellantworten auslösen.^[27]

Ein natürlicher Inhibitor ist der cAMP-abhängige Proteinkinase Inhibitor alpha (PKI), welcher eine Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich zu dieser Kinase aufweist.^[20,28] Ein Fragment des PKIs (5-24, TTYADFIASGRTGRRNAIHD) wurde in dieser Arbeit für eine Stabilisierung der PKA verwendet.

Eine Isoform der katalytisch aktiven Untereinheit ist die in dieser Arbeit untersuchte C_α -Untereinheit, welche von dem Gen PRKACA kodiert wird.^[29] **Abbildung 1.5** zeigt die C_α -Untereinheit, bestehend aus zwei globulären Domänen. Der kleine und der große Lobus sind über eine Scharnierregion, die sogenannte *Hinge*-Region, miteinander verbunden. Sie bildet die Bindestelle für das natürliche Substrat ATP, welche für die Wirkstoffforschung von Interesse ist.^[20] Die Bindung von ATP und weiteren Verbindungen in diesem Bereich bewirkt eine verbrückte Wechselwirkung des kleinen und großen Lobus und sorgt für eine Stabilisierung des gesamten Proteins.

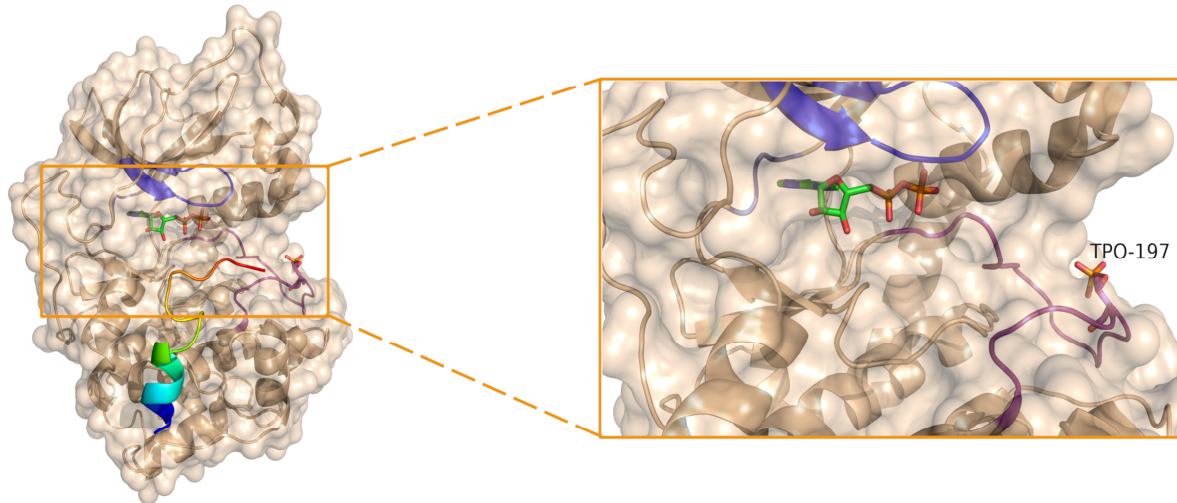


Abbildung 1.5: Struktur der katalytischen Untereinheit der CHO PKA (6Y8C) im Komplex mit ATP (grün) und PKI (bunt). In dunkelblau ist die flexible Glycin-reiche Schleife markiert. Das phosphorylierte Thr197 des Aktivierungsloops (lila) ist rechts detaillierter gezeigt. Außerdem ist hier auch das mit der Hinge-Region (hellblau) wechselwirkende ATP näher zu sehen. Der Datensatz wurde während meiner Masterarbeit aufgenommen.

Der kleine Lobus weist fünf konservierte, antiparallele β -Faltblattstränge mit den Aminosäuren 40-120 auf. Zu diesem Lobus gehört auch die flexible Glycin-reiche Schleife, welche Ligand-induzierte Konformationsänderungen eingehen kann. Dieser Bereich positioniert das γ -Phosphat von ATP über ein Magnesiumion und stellt einen wichtigen Teil für die katalytische Wirkung der PKA dar.^[20]

Im Kontrast zu dem kleinen Lobus besteht der große Lobus (Aminosäuren Met128-Thr300) vorwiegend aus α -Helices und ist wesentlich hydrophober und stabiler. Es treten keine relevanten Ligand-induzierten Konformationsänderungen auf.^[20] Die Aktivierungsschleife enthält Thr197 und ist entscheidend für den aktiven Status der PKA. Bei der Expression in *E. coli* wird Thr197 autophosphoryliert und wurde bisher noch in keinem anderen Zustand beobachtet.^[30] Dieses Phosphat bringt die Aktivierungsschleife und somit die PKA in eine aktive Konformation. Daran beteiligt ist auch das DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly 186-188), indem es Arg165 in eine bestimmte Position bringt. Arg165 wiederum hält Thr197 über das Phosphat vermittelt in Position.^[20]

Der katalytische Mechanismus (**Abbildung 1.6**) der Proteinkinase A verläuft über eine Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf ein zu phosphorylierendes Substrat.

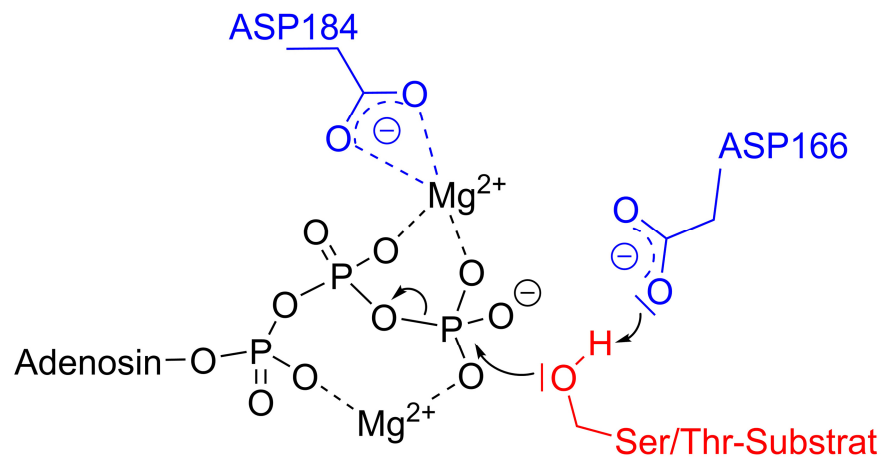


Abbildung 1.6: Mechanismus der PKA zur Übertragung von Phosphat. Dieses nach KLEBE-Wirkstoffdesign^[31] erstellte Schema zeigt den Mechanismus der Proteinkinase A für die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf ein Serin/Threonin-enhaltendes Substrat. Zwei Magnesium-Ionen halten die Phosphatgruppen in Position. Ein über das Asp184 (blau) verbrücktes Magnesium-Ion stabilisiert die negative Ladung des β/γ -Phosphats von ATP und bevorzugt dadurch den Angriff eines Substrates (rot). Dieses hat eine erhöhte Nucleophilie, weil ein Proton an das Asp166 abgegeben wird.

Der Adeninrest bindet an die *Hinge*-Region und zwei Magnesium-Ionen halten die Phosphatgruppen in Position für einen nucleophilen Angriff des Substrates auf das γ -Phosphat von ATP. Die PKA ist Serin/Threonin-spezifisch und bewirkt eine erhöhte Nucleophilie des Substrates, weil das Asp166 ein Proton der Serin/Threonin-Seitenkette aufnehmen kann. Weiterhin stabilisiert ein über das Asp184 verbrücktes Magnesium die negative Ladung des β/γ -Phosphats und ermöglicht den nucleophilen Angriff des Substrats auf das γ -Phosphat.^[31] Die Phosphorylierung kann beispielsweise bei Proteinen dessen Aktivierung/Deaktivierung bewirken und somit verschiedene Zellantworten auslösen.

1.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Bei Raumtemperatur liegen die meisten Moleküle in ihrem energetischen Grundzustand vor. Erst mit der Absorption energiereicher Photonen kann das Molekül in ein angeregtes Energieniveau gehoben werden.^[32] Im nächsten Schritt wird nach Energieverlust ein Photon mit geringerer Energie und größerer Wellenlänge emittiert und das Molekül fällt in seinen Grundzustand zurück. Liegt die Wellenlänge im sichtbaren Bereich so kann diese mit dem Auge beobachtet werden. Emissionen von Photonen höherer Energien können mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Dieses besteht aus einer Lichtquelle, welche mit Linsen auf einen dichromatischen Spiegel fokussiert wird.^[33] Von diesem führt der Strahlengang auf die zu untersuchende Probe. Die Emission der Probe wird im 90°-Winkel zu der Lichtquelle wiedergegeben und ihr Strahlengang führt erneut durch den dichromatischen Spiegel.^[33] An diesem wird Licht einer bestimmten kurzen Wellenlänge reflektiert und Licht längerer Wellenlängen transmittiert. Da die Wellenlänge des emittierten Lichts immer größer als die des Einfallenden ist, wird mit dem dichromatischen Spiegel eine Überlagerung beider verhindert.^[32,33]

Auf diese Weise können beispielsweise fluoreszenzmarkierte Zellen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht und Studien hierzu durchgeführt werden.^[34] Weitere Untersuchungsmöglichkeiten bieten die in dieser Arbeit untersuchten Proteinkristalle, in welche fluoreszierende Moleküle eingebracht werden und den Kristall fluoreszent erscheinen lassen. Entscheidend ist hier die Diskriminierung der aus dem Inneren des Kristalls emittierten Fluoreszenz, mit der Fluoreszenz, welche von der Lösung außerhalb des Kristalls ausgeht (vgl. **Abschnitt 4.2**). Diese Anforderung führt zu der Methode der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

Im Unterschied zu einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop bietet die konfokale Variante eine exakte Wiedergabe der Fluoreszenz in einem sehr kleinen Bereich. Ein kleinerer Bereich senkt jedoch die Intensität der emittierten Strahlung.^[33] Daher kommt hier ein Laser (*engl. light amplification by stimulated emission of radiation*) mit höherer Intensität als andere Lichtquellen zum Einsatz, sodass eine hohe Ortsauflösung erreicht wird. Über einen dichromatischen Spiegel wird das Anregungslicht

über zwei weitere Spiegel auf die Probe gelenkt. Bevor der Strahl die Probe erreicht, passiert dieser zwei Linsen, welche den entscheidenden Unterschied zu einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop bilden.^[33]

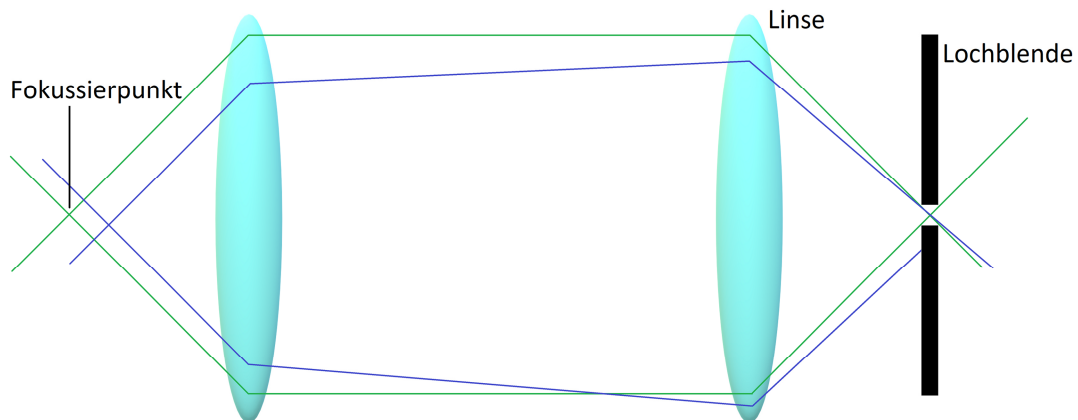


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der für die konfokale Mikroskopie entscheidende Linseneinheit. Von dem Fokussierpunkt aus gelangt die gesamte Emission (grüne Linie) durch die Lochblende und anschließend auf den Detektor. Für andere Punkte (z.B. die blaue Linie) gelangt idealerweise kein Emissionslicht durch die Lochblende. Dieses Schema wurde unter Hilfenahme von SEMWOGERERE und WEEKS Abschnitt in „Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering“ angefertigt.^[33]

Die in **Abbildung 1.7** schematisch dargestellte Linsen-Einheit ist entscheidend für die Fokussierbarkeit in x-/y- und z-Richtung, da sie einen Fokussierpunkt erzeugt. Nur aus exakt diesem Punkt emittierte Photonen werden über die Linsen zurück durch eine kleine Lochblende gelenkt, sodass eine Hintergrundstrahlung nahezu ausgeschlossen werden kann.^[33] Mithilfe geeigneter Software können über eine Rasterung von verschiedenen Punkten eine 3D-Visualisierung eines fluoreszierenden Proteinkristalls und anderen Untersuchungsobjekten erstellt werden.

1.5 Fluoreszenz-basierte Aktivitätsmessungen

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Affinitätsdaten bietet das „ZLYTE™ Kinase Assay Kit“ von INVITROGEN/THERMO FISHER SCIENTIFIC. Der nachfolgende Theorieteil ist auf Grundlage der Produktliteratur des Vertreibers geschrieben.^[35]

Mithilfe dieses Assays kann die Aktivität in Abhängigkeit von Inhibitoren der PKA bestimmt werden. Ein Vergleich mit der Aktivität ohne Inhibitor gibt Aufschlüsse über dessen Hemmwirkung. Zentraler Bestandteil ist ein Peptid, welches über einen gewissen Zeitraum in einer PKA und ATP enthaltenen Lösung phosphoryliert wird. Je höher der Phosphorylierungsgrad, desto höher ist die Aktivität der PKA. Nach diesem ersten Schritt wird ein weiteres Reagenz („Entwicklungsreagenz“, *engl. development reagent*^[35]) in alle zu untersuchenden Titerplatten-Vertiefungen gegeben, welches spezifisch nur das nicht phosphorylierte Peptid spaltet. Das Peptid enthält ein Coumarin und ein Fluorescein, welche bei einer Wellenlänge von 445 nm und 520 nm ihre Emissionsmaxima aufweisen. Ungespalten wird die Emission von Coumarin durch Förster Resonanzenergietransfer (FRET) verringert. Hierbei können emittierte Photonen von dem angeregten Zustand eines FRET-Donators direkt von einem FRET-Akzeptor absorbiert werden.^[9] Mit abnehmender Distanz zueinander wird dieser Energietransfer größer.^[9] Das gespaltene Peptid sorgt für eine sehr große Distanz zwischen Donator und Akzeptor, weshalb kein Energietransfer stattfinden kann. Auf Grundlage dieser Emissions-Diskrepanz zwischen gespaltenem und nicht gespaltenem Peptid lässt sich das Emissionsverhältnis (EV) formulieren:^[35]

$$EV = \frac{\text{Coumarin Emission}}{\text{Fluorescein Emission}} \quad (1.5)$$

Hierbei beschreibt ein geringes Emissionsverhältnis einen hohen Anteil an phosphoryliertem Peptid und eine hohe Aktivität der PKA, was einer geringen inhibitorischen Wirkung des untersuchten Inhibitors gleichkommt. Analog gilt eine hohe inhibitorische Wirkung für ein hohes Emissionsverhältnis.

Für eine Versuchsreihe werden verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Verbindungen in die Vertiefungen einer Titerplatte gegeben. Es tritt ein sigmoidaler Verlauf bei einer Auftragung der

Ligandkonzentration gegen den nicht phosphorylierten Anteil des Peptids auf. Am Wendepunkt kann die Konzentration abgelesen werden, welche der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) der jeweiligen Verbindung entspricht. Kalkuliert wird der prozentuale Anteil der Phosphorylierung (abgekürzt mit %P) mithilfe der nachfolgenden Formel:^[35]

$$\%P = 1 - \frac{(EV \cdot F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + EV \cdot (F_{100\%} - F_{0\%})} \quad (1.6)$$

Für die 100% Phosphorylierungs-Kontrolle von Coumarin ($C_{100\%}$) und Fluorescein ($F_{100\%}$) dient ein bereits phosphoryliertes Peptid, welches in eine Titerplatten-Vertiefung als Referenz pipettiert wird. Weiterhin gibt es eine 0% Phosphorylierungs-Kontrolle für Coumarin ($C_{0\%}$) und Fluorescein ($F_{0\%}$), bei welcher kein ATP in der Lösung vorhanden ist. Dadurch kann keine Phosphorylierung des Peptids stattfinden und dieses wird in der „Entwicklungsreaktion“ (engl. *development reaction*^[35]) komplett gespalten. Dieser Wert wird als Referenzwert für eine 100%ige Spaltung in obiger Gleichung berücksichtigt, auch wenn die Spaltung gegebenenfalls nicht vollständig abgelaufen ist.

Eine höhere Aussagekraft als der IC_{50} -Wert bietet der K_i -Wert, da bei diesem das Bindungsgleichgewicht zwischen Ligand und Protein berücksichtigt wird.^[36,37] Zur Ermittlung des K_i -Werts wird eine Messreihe erstellt, in welcher das Substrat in verschiedenen Konzentrationen vorliegt. In diesem Fall ist das zu berücksichtigende Substrat ATP, weil die untersuchten Inhibitoren (*Hinge-Binder*) kompetitiv zu ATP an die PKA binden. Zunächst wird der Umsatz an ATP pro Sekunde (Reaktionsgeschwindigkeit v) durch die Kenntnis der Peptidkonzentration (c_{Pep}) und den Phosphorylierungsgrad (%P) nach **Gleichung 1.7** erhalten.

$$v = \frac{c_{Pep} \cdot \%P}{t} \quad (1.7)$$

Der Umsatz an ATP kann mit der Peptidkonzentration berechnet werden, da bei der Reaktion ein Molekül ATP für ein Molekül zu phosphorylierenden Peptid benötigt wird. Die Reaktionszeit t beträgt 3600 s bei einer Peptidkonzentration von 2 μ M.

Nach einer LINEWEAVER-BURK-Auftragung^[38] der inversen Reaktionsgeschwindigkeit ($1/v$) gegen die inverse ATP-Konzentration ($1/[ATP]$) wird eine lineare Anpassung der ermittelten Umsatz-Werte vorgenommen. Der Schnittpunkt der linearen Anpassung mit der x-Achse liefert die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) für die hier unter den gegebenen Konditionen untersuchte Reaktion.

Mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung^[37] werden die K_i -Werte für die Inhibitoren berechnet:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[ATP]}{K_m}} \quad (1.8)$$

1.6 Strukturuntersuchung an Proteinkristallen

Neben den affinitätsbezogenen und thermodynamischen Betrachtungen bietet die Methode der Protein-Röntgenkristallographie eine Visualisierung von Struktur-Wirkungsbeziehungen. Hierfür müssen zunächst Proteinkristalle gezüchtet werden.

1.6.1 Kristallisation

Proteinkristalle können bei geeigneten Kristallisationsbedingungen erhalten werden. Das Ziel ist es, die Bedingungen so zu wählen, dass die Sättigung der Proteinlösung in eine labile Phase (siehe **Abbildung 1.8**) überführt wird.^[39] Geschieht dies langsam, können möglichst isomorphe Kristalle erhalten werden. Ist der Prozess zu schnell, dann denaturiert das Protein und fällt als Niederschlag aus. Nur isomorph zusammengesetzte Kristalle mit möglichst hoher Ordnung können für die Röntgenstrukturanalyse verwendet werden.^[40]

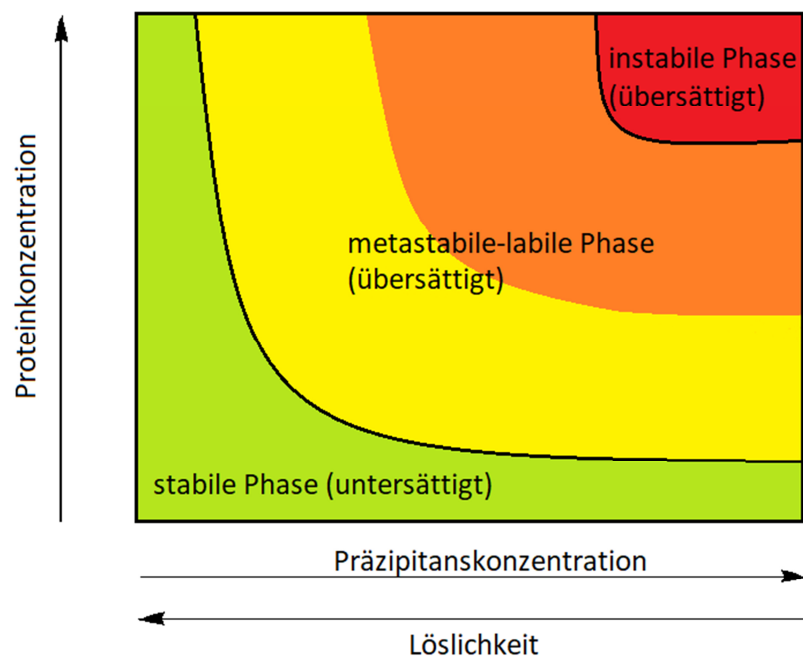


Abbildung 1.8: Phasendiagramm nach Rupp^[41] für eine Proteinlösung. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen ist die Löslichkeit auch bei hoher Präzipitankonzentration hoch (stabile Phase, grün). Mit höherer Konzentration von Protein und Präzipitans sinkt die Proteinlöslichkeit und es wird die metastabile-labile (gelb-orange) bis hin zur instabilen Phase (rot) erreicht.

Zwei in dieser Arbeit verwendete Kristallisationsansätze sind die Methoden des hängenden und sitzenden Tropfens. Beide beruhen auf dem Prinzip der Dampfdruckdiffusion.^[42] Bei der Methode des sitzenden Tropfens wird die Kristallisationslösung in Vertiefungen einer Kristallisationsplatte pipettiert. Die Vertiefungen werden luftdicht verschlossen. Im Falle des hängenden Tropfens wird die Kristallisationslösung auf mehrere Glasplättchen aufgeteilt. Diese werden auf die Vertiefungen einer Kristallisationsplatte gebracht und luftdicht verschlossen. Bei beiden Methoden wird beispielsweise ein Methanol/Wasser-Gemisch in das Reservoir gefüllt, wodurch es über die Zeit zu einer Diffusion von Methanol in den Kristallisationstropfen kommt. Hierdurch wird der Aktivitätskoeffizient des Wasser und damit die Löslichkeit herabgesetzt.^[39] Bei der richtigen Dosierung können Proteinkristalle erhalten werden. Hierbei spielt die Zusammensetzung der Lösung, speziell die Puffer- und Salzkonzentrationen sowie der pH-Wert eine Hauptrolle. Die richtigen Bedingungen zu finden kann eine lange Zeit in Anspruch nehmen.

1.6.2 Kristallographie

Zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von biologischen Makromolekülen können unter anderem Röntgen- und Neutronendiffraktionsexperimente herangezogen werden.^[39] Mithilfe eines Röntgenbeugungsexperiments kann die Struktur eines Proteins in seinem Kristall bis hin zu atomarer Auflösung aufgeklärt werden. Bei diesem Experiment zeigt ein Proteinkristall ein Beugungsmuster, welches über Fourier-Transformation und unter Kenntnis der Phasen der einzelnen Röntgenreflexe in eine Elektronendichteverteilung umgerechnet wird. Hierbei können Auflösungen von unter 1 Å erhalten werden. Dies ist vor allem mit hochenergetischer Synchrotronstrahlung möglich, welche an Elektronenspeicherringen wie dem BESSY II am Helmholtz-Zentrum Berlin erzeugt werden.^[43]

Die Erzeugung der Strukturfaktoren erfolgt im Schritt der Prozessierung. Sie bezeichnen die mathematische Darstellung der am Kristall gebeugten Welle und bestehen aus der Amplitude sowie der Phase einer Welle.^[44] Aus einem Röntgenbeugungsexperiment kann die Phase zunächst nicht bestimmt werden, sodass die Elektronendichte und somit die Struktur nicht erzeugt werden kann.^[44] Das sogenannte „Phasenproblem“ lässt sich z.B. mithilfe des molekularen Ersatzes lösen. Hierbei wird eine bereits bestimmte Struktur mit bekannten Phasen als Modell verwendet, um die Phasen der neuen Struktur zu bestimmen. Weitere, nicht in dieser Arbeit verwendete Möglichkeiten zur Lösung des Phasenproblems stellen unter anderem die Methode eines MAD-Experiments (**M**ultiple **a**nomale **D**ispersion) oder die Patterson Methode dar.^[45]

Nach dem Lösen des Phasenproblems und der Erstellung einer Karte der Elektronendichteverteilung wird die Strukturverfeinerung in einem sich wiederholenden Zyklus abgeschlossen. Dieser besteht aus einer automatisierten Verfeinerung und dem Modellbau. Der Modellbau dient zur manuellen Anpassung des Modells in die Elektronendichte. Der Grund für eine cyclische Verfeinerungen ist, dass die Amplitude proportional zu den Strukturfaktoren beiträgt und die Phase jedoch exponentiell ins Gewicht fällt.^[45] Somit kommt den Phasen eine höhere Gewichtung zu. Mit fortlaufender Anpassung des Modells an die Elektronendichte stimmen die Phasen des Modells mit den experimentellen Phasen besser überein. Dadurch wird die Elektronendichteverteilung nach der automatisierten Verfeinerung

besser wiedergegeben und der Modellbau kann an der verbesserten Dichte weitergeführt werden. Dieses Vorgehen wird bis zur Konvergenz fortgeführt.^[45]

1.7 Zielsetzung

Diese Arbeit ist in sechs Projekte unterteilt, in welchen die Bindungseigenschaften von unterschiedlichen chemischen Verbindungen an die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A geklärt werden sollen. Hierbei dient die Proteinkinase A als ein Modellenzym, da diese bereits sehr gut untersucht ist. Neben den thermodynamischen Betrachtungen der Bindungseigenschaften sollen die kristallographischen Analysen den Hauptteil dieser Arbeit einnehmen. Weiterhin soll eine Fluoreszenz-basierte Versuchsreihe Aufschluss über die Affinität einiger Verbindungen an die Proteinkinase A liefern. Ein Teil der Projekte beinhaltet auf Grundlage der Fragment-basierten Wirkstoffentdeckung (englisch: *fragment-based drug discovery*, kurz FBDD) die Untersuchung von kleinen Molekülen, welche als Fragmente bezeichnet werden. In weiteren Projekten werden größere Liganden untersucht, die bereits Folgeverbindungen initialer Leitstrukturen darstellen.

In der medizinisch-chemischen Optimierung von Wirkstoffkandidaten werden Leitstrukturen gesucht und im weiteren Verlauf an das Zielprotein angepasst. Für diese Anpassung werden etablierte Bioisosterie-Regeln berücksichtigt, die jedoch nicht immer zu den gewünschten Optimierungen führen. Im ersten Projekt (**Kapitel 2**) soll daher mit einer aufgestellten Fragmentserie geklärt werden, wie sich der bioisostere Ersatz auf die Bindung kleiner Fragmente an dem Modellenzym PKA auswirkt.

Zentraler Gegenstand des zweiten Projekts (**Kapitel 3**) ist die angewandte Methode der Protein-Ligand-Komplexbildung. Hierbei werden Liganden nach dem Kokristallisations- und *Soaking*-Verfahren mit der PKA in einem Komplex erhalten und nach möglichen Unterschieden kristallographisch untersucht. Es soll geklärt werden, ob die nach der zeit- und ressourcensparenden *Soaking*-Methode erhaltenen Strukturen den Nachteil bergen, Bindungsmotive nicht korrekt darzustellen.

In einem weiteren Projekt (**Kapitel 4**) soll eine Methode entwickelt werden, um kristallographische Treffer vor dem röntgenkristallographischen Vermessen der Kristallstruktur zu ermitteln. Dies soll Zeit und Kosten ersparen, da Kristalle, in denen keine Bindung mit einem Fragment erfolgte, nicht mehr zu einer Strahlenquelle gesendet und vermessen werden müssten.

In **Kapitel 5** wurde eine Serie von Fragmenten aufgestellt, welche von dem bekannten Wirkstoff Fasudil und dem natürlichen Substrat ATP der PKA abgeleitet sind. Das Ziel ist die thermodynamische und kristallographische Bindungscharakterisierung dieser Fragmente an der PKA und die Klärung möglicher Unterschiede. Eine interessante Frage ist hierbei: Wie ist die Entwicklung des Wirkstoffs Fasudil vor dem Hintergrund der untersuchten Fragmente zu beurteilen? Und wie hätte eine Optimierung auf Grundlage des kleinsten Fragment Isochinolin als Leitstruktur aussehen können?

Das nächste Projekt ist in **Kapitel 6** beschrieben und behandelt eine Reihe von größeren chemischen Verbindungen. Diese wurden zuvor durch Erweiterungen von neuen Grundgerüsten erhalten, nachdem letztere in einer *in silico* Durchmusterung einer von ANALYTICON DISCOVERY aufgestellten Bibliothek gefunden wurden. Da diese Fragment-Bibliothek auf Grundlage von Naturstoffen aufgebaut ist, bietet diese die Möglichkeit zur Findung neuer Klassen von Leitstrukturen.

Das letzte Projekt (**Kapitel 7**) geht auf eine sukzessive Wirkstoffentwicklung basierend auf dem *Hinge*-Binder Phenol zurück. Da die Liganden in früheren Arbeiten racemisch vorlagen, bieten die bereits gemessenen Affinitätswerte keine verlässliche Aussagekraft. In dieser Arbeit soll die *R*-konfigurierte Verbindung getrennt von der *S*-konfigurierten Variante untersucht werden.

2. Fragment-Bindung an die Kinase-Scharnier-Region: Wenn Ladungsverteilung und lokale pK_a-Verschiebungen etablierte Bioisosterie-Konzepte fehlleiten

2.1 Einleitende Bemerkungen

In diesem Kapitel wurde die gleichnamige Veröffentlichung übernommen, welche in der Fachzeitschrift *Angewandten Chemie* als Zuschrift akzeptiert wurde.^[46] Die *Supporting Information* (deutsch: unterstützende Informationen) wurde in das deutsche übersetzt und in dieses Kapitel unter den Punkten **2.5-2.7** eingepflegt. Die Veröffentlichung wurde durch Beiträge von DR. CHRISTOF SIEFKER, BJÖRN WAGNER, PROF. DR. ANDREAS HEINE UND PROF. DR. GERHARD KLEBE ermöglicht. Mein Anteil war die röntgenkristallographische Aufnahme von 11 Protein-Ligand-Komplexen (**1, 5, 7-12, 14, 17, 19**). Dazu zählte die Proteinexpression, -aufreinigung und -kristallisation, sowie die Analyse und Deponierung der Datensätze in der PDB. Weiterhin habe ich die Proteindatenbank-Analyse mit dem GeoMine-Programm durchgeführt. Das Manuskript habe ich zusammen mit Herrn PROF. DR. GERHARD KLEBE entworfen, welcher auch die Übersetzung des Hauptteils in die deutsche Sprache übernommen hat.

2.2 Einleitung

Die medizinisch-chemische Optimierung folgt einer Strategie, funktionelle Gruppen zu ersetzen und größere Substituenten an ein vielversprechendes Leitstrukturgerüst anzufügen. Wohl etablierte Bioisosterie-Regeln werden berücksichtigt, dennoch ist es schwierig abzuschätzen, ob die durchgeführten Modifikationen auch wirklich den Anforderungen einer Bindestelle gerecht werden. Die Elektronendichteverteilung und die pK_a-Werte der Liganden werden moduliert und beeinflussen so Protonierungszustände und Bioverfügbarkeiten. Unter Berücksichtigung des benachbarten H-Brücken-Donor/Akzeptor-Musters des Scharnierbindungsmotivs (*“Hinge-Region”*) einer Kinase untersuchten wir kristallographisch eine Reihe von Fragmenten, um zu sehen, ob sie das erforderliche Interaktionsmuster erwidern können. Unerwarteterweise sind Benzoessäure und Benzamidin, mit den richtigen Substituenten dekoriert, ebenso wie ein Carboxamid oder eine phenolische OH-Gruppe völlig bioisoster. Ein einzähniger Pyridinstickstoff übertrifft sogar zweizählige Funktionalitäten am Liganden.

Die Bedeutung der korrekten Einstellung von pK_a-Werten der angefügten funktionellen Gruppen am Liganden durch zusätzliche Substituenten am Molekülgerüst wird damit offensichtlich.

Die Leitstrukturoptimierung in der medizinischen Chemie folgt in der Regel einer Strategie, bei der ein vielversprechendes Grundgerüst einer Leitstruktur modifiziert wird, indem funktionelle Gruppen ersetzt und größere Substituenten und Molekülteile angefügt werden, so dass ein Bindungsverhalten unverändert erhalten bleibt. Dabei werden etablierte Regeln der Bioisosterie berücksichtigt.^[47–51] Heutzutage fließen meist Strukturdaten des Zielproteins mit in das Design ein und Dekorationen des Grundgerüsts werden hinsichtlich des sterischen Anspruchs und einer Wechselwirkungs-Komplementarität mit der Proteinbindestelle ausgewählt. Auch dieser Schritt ist wieder von Bioisosterie-Überlegungen geprägt und kann durch Modellierungssoftware unterstützt werden. Ebenso werden Proteine mit ähnlichen Taschen konsultiert, um über die dort bindenden Liganden Ideen für das weitere Design zu erlangen.^[52,53] Die stetig wachsende Zahl an Kristallstrukturen, die in der öffentlich zugänglichen PDB-Datenbank hinterlegt sind, verleiht solchen Strategien das erforderliche Potential.^[54]

Es ist jedoch äußerst schwierig abzuschätzen, ob die gewählten Auswechselungen von funktionellen Gruppen oder Gerüsterweiterungen ideal zu den Eigenschaften der vorgegebenen Bindungsstelle passen. Die Beurteilung dieser Auswahl betrifft Eigenschaften wie die korrekte Platzierung einer geladenen oder stark polarisierten Gruppe, die die Gesamtverteilung der Elektronendichte über die angefügte Gruppe beeinflusst oder die Einstellung eines optimalen pK_a-Wertes bestimmt. Dies legt die Protonierung des Liganden fest und beeinflusst dessen Bioverfügbarkeit.^[55–58] Darüber hinaus wird auch das Grundgerüst, an das die bioisostere Austauschgruppe chemisch gebunden wird, je nach der Chemie zum Erstellen der Verknüpfung einen Einfluss nehmen. Diese Einflüsse können sterischer wie elektronischer Natur sein. Letztere werden die Elektronendichteverteilung im Molekül in Abhängigkeit von der gewählten Verknüpfungschemie abwandeln. Folglich können pK_a-Werte oder die Platzierung und Direktionalität von Wechselwirkungen verändert werden.^[59] Daher ist es kaum möglich exakt vorherzusagen, ob z. B. die erforderlichen pK_a-Eigenschaften der zu ersetzenden funktionellen Gruppe

optimal zu den Wechselwirkungen passen, die von der Gegengruppe des Proteins verlangt werden. Dazu ist es wahrscheinlich, dass die Proteinumgebung Effekte induziert, die die Elektronendichte umverteilen und den Liganden zusätzlich polarisieren.^[60] Infolgedessen müssen Medizinische Chemiker oft feststellen, dass der geplante bioisostere Ersatz nicht die erwartete Affinitätssteigerung in den neu entworfenen und mühsam synthetisierten Zielmolekülen erreicht.

Hier wäre die folgende Information sehr wertvoll: Wie würde die für den Ersatz geplante Gruppe an das Protein binden, wenn sie frei von räumlichen und elektronischen Zwängen durch die Bindung an das Grundgerüst der Leitstruktur mit dem Protein interagieren könnte? So würde das optimale Interaktionsmuster mit der Proteinumgebung offensichtlich. Eine Möglichkeit könnte die Verwendung von ausgeklügelten Modellrechnungen sein, um diese Frage zu beantworten. Da es sich jedoch um Verschiebungen der Elektronendichte, Polarisierungseffekte und in der Folge um Modulationen von Protonierungszuständen handelt, werden nur quantenchemische Berechnungen auf hohem Niveau aussagekräftige Antworten liefern.^[61–65] Diese sind derzeit noch weit von einer Routineanwendung auf Proteine entfernt. Es erfordert langjährige Erfahrung in der adäquaten Verwendung solcher Berechnungen, um schlüssige Informationen zu erhalten. Darüber hinaus benötigen sie enorme Rechenkapazitäten. Als Alternative könnte daher, zumindest solange solche dringend benötigten Werkzeuge fehlen, auf experimentelle Daten zurückgegriffen werden.

Wir haben kürzlich aus Neutronenbeugungsversuchen gelernt, die experimentell zuverlässige Informationen über Wasserstoffatome in Protein-Ligand-Komplexen liefern, dass die Aminogruppe des Anilins protoniert wird, sobald das Molekül in der S1-Tasche der Serinprotease Trypsin gebunden wird. Diese Tasche beherbergt an ihrem tiefvergrabenen Ende eine negativ geladene Carboxylatgruppe eines Aspartatrests. Formal entspricht die Protonierung von Anilin einer Verschiebung des pK_a-Werts von Anilin (pK_a=4.6) in Wasser um vier Größenordnungen wenn man berücksichtigt, dass die Kristallisation bei einem pH=7.5 vorgenommen wurde. Überraschenderweise beträgt der gegenseitige Abstand zwischen der Ammoniumgruppe des Anilins und der Carboxylatgruppe des Proteins 4 Å.^[66]

Da dieses Beispiel zeigt, dass langreichende Polarisierungseffekte schwer vorherzusagen sind und die Entwicklung geeigneter Rechenmodelle experimentelle Referenzinformation benötigt, beschlossen wir, einen experimentellen Ansatz zu verfolgen. Er sollte Daten über die Modulation der Bindungseigenschaften von funktionellen Gruppen sammeln, von denen erwartet wird, dass sie bioisostere Eigenschaften aufweisen. Wir wollten sehen, wie sich solche Gruppen an der Proteinbindestelle verhalten, wenn keine räumliche Beschränkung durch die Bindung an das Grundgerüst eines größeren Liganden vorliegt. Für unsere Studie wählten wir die Scharnierregion einer Kinase und untersuchten eine Reihe niedermolekularer Sonden, auch "Fragmente" genannt,^[67] im Hinblick auf ihre angenommenen Bindepotionen an dem Kinase-*Hinge*-Motiv. Wir berücksichtigten insbesondere die pK_a-Eigenschaften und die Modulation der Elektronendichteverteilung über das Grundgerüst in Abhängigkeit der angefügten Substituenten.

In den letzten 30 Jahren wurde ein weites Spektrum chemischer Strukturbausteine entdeckt, die das Erkennungsmuster komplementieren, das durch die Aminosäuren der Kinase-*Hinge*-Region vorgegeben wird.^[68,69] Es wurden ein-, zwei- und dreizählige Interaktionsmuster vorgeschlagen, die mit dem Peptidstrang der Scharnierregion wechselwirken können.^[70] Beobachtete Unterschiede in diesen Motiven wurden ausgenutzt, um nicht nur die Affinität, sondern insbesondere die Selektivität für einzelne Mitglieder des Kinoms zu optimieren.^[71–73]

Wir wählten die gut kristallisierende und umfassend untersuchte cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aus.^[74] Sie erkennt den Adeninteil des natürlichen Substrats ATP und nutzt benachbarte Donor- und Akzeptorfunktionalitäten der zugänglichen Peptidbindungen der Scharnierregion, um den Kofaktor über Wasserstoffbrücken zu binden.^[75] Ein ideales Pendant zur Ergänzung des vorgegebenen Donor-/Akzeptormusters der *Hinge*-Region wäre daher eine Carboxamidgruppe im Liganden. Wir begannen daher mit Benzamid als Fragmentsonde. Der eingenommene Bindungsmodus an der *Hinge*-Region weist das erwartete H-Brückenbindungsmuster zweier parallel ausgerichteter Donor-/Akzeptorfunktionen mit der Scharnierregion auf. Zu unserer Überraschung ändert sich jedoch durch die Einführung eines pyridinähnlichen Stickstoffs im Phenylring die Bindungspose völlig, und das

Fragment zieht es vor, seinen Pyridinstickstoff zur Interaktion mit der Scharnierregion zu verwenden. Die Anlagerung einer Aminogruppe als elektronenschiebender Substituent zeigt wiederum die erwartete Bindungspose. Aber schon die Einführung einer Hydroxylgruppe verändert die Bindungsgeometrie und ein Teil der Moleküle interagiert über die Hydroxylgruppe mit der *Hinge*-Region.

Diese recht überraschenden Ergebnisse, die mit sehr einfachen Liganden erzielt wurden, haben uns dazu angeregt, unsere Studie auf eine Vielzahl anderer funktioneller Gruppen, einschließlich Benzoessäuren und Benzamidine, auszudehnen. Völlig unerwartet ergaben sich eine Benzoessäure und ein Benzamidin, wenn sie mit den richtigen Substituenten versehen sind, als zwanglos bioisoster, vorausgesetzt der korrekte Protonierungszustand stellt sich ein.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

Es gelang uns, die Kristallstrukturen von 19 Fragmenten mit einem zentralen aromatischen Ring und daran angefügter Substituenten mit abweichenden Eigenschaften zu bestimmen (**Tabelle 2.1**). Ihre pK_a-Werte wurden in wässriger Lösung vermessen. Alle Fragmente binden im aktiven Zentrum neben der Scharnierregion, wo sonst der natürliche Ligand ATP gebunden wird. Die einzelnen Bindungsmodi von **1-19** sind in **Tabelle 2.1** schematisch skizziert und in **Abbildung 2.1**, **Abbildung 2.2** und **Abbildung 2.3** dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Bindungsmodi mit den verschiedenen Interaktionsmustern wird im Folgenden in **Abschnitt 2.5** zusammen mit dem zur Bestimmung der pK_a-Werte angewendeten Protokoll (vgl. **Abschnitt 2.7**) beschrieben.

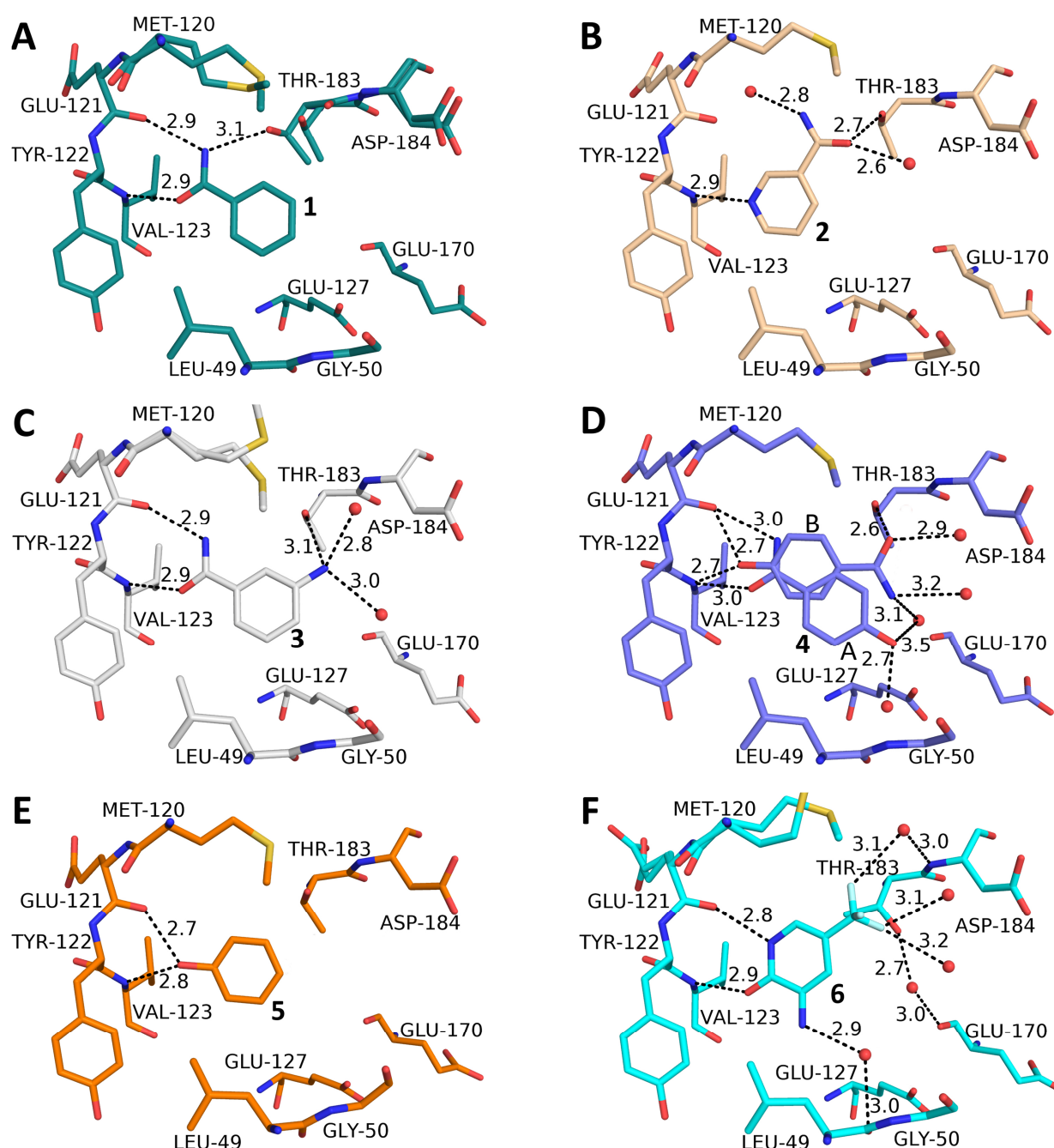


Abbildung 2.1: Überblick über die verschiedenen Liganden, wie sie an die Scharnierregion der PKA binden. (A) Benzamid **1** (PDB-Code: 6SNX), (B) Pyridin-3-carboxamid **2** (5N3H), (C) 3-Aminobenzamid **3** (5N3Q), (D) 4-Hydroxybenzamid **4** (5N3S), (E) Phenol **5** (6Z44), (F) 3-Amino-5-(trifluormethyl)-1H-pyridin-2-on **6** (5N33). Hier und in den folgenden Bildern sind die Heteroatome dem Typ entsprechend kodiert (N: blau, O: rot, F: türkis, S: gelb, Wassermoleküle: rote Kugeln, H-Bindungen als gestrichelte Linien mit Abständen in Å. Kohlenstoffatome sind für die verschiedenen Komplexe unterschiedlich gefärbt).

Bei Kinasen stellt die Scharnierregion ein typisches Erkennungsmuster bereit, an das das natürliche Substrat ATP bindet. Da sich die Arzneimittelentwicklung auf die Hemmung der ATP-Bindungsstelle konzentriert hat, müssen vermeintliche Leitstruktur-Kandidaten funktionelle Gruppen enthalten, die auf dieses Muster reagieren können. Die Scharnierregion gibt die Amidbindungen des Peptidrückgrats vor, an die über Wasserstoffbrückenbindungen der mutmaßliche niedermolekulare Ligand bindet. Daher scheint ein alternativ ausgerichtetes Muster von H-Brücken-Donor- und Akzeptor-Funktionen auf den ersten Blick ideal zu sein, um die Eigenschaften des Proteins zu erwidern.

Um die Bindungseigenschaften niedermolekularer Liganden mit den gewünschten Eigenschaften zu untersuchen, wählten wir kleine aromatische Fragmente aus, die eine Carboxamid-Funktion an oder eingebettet in das aromatische Ringsystem aufweisen. Erwartungsgemäß weist ein großer Teil der untersuchten Fragmente genau das erwartete Muster von zwei nahezu parallelen Wasserstoffbrückenbindungen zu der Scharnierregion auf (vgl. Fragmente **1, 3, 4, 7, 8, 9, Abbildung 2.1** und **Abbildung 2.2**). Ziemlich überraschend ist die Bindungsposition von **2**, da dieses Fragment mit seinem pyridinähnlichen Stickstoff an die Scharnierregion bindet und die Carboxamidgruppe in ein Netzwerk von überbrückenden Wassermolekülen eingebettet ist. Der Stickstoff vom Pyridintyp besitzt einen pK_a-Wert von 3.37 in wässriger Lösung und ist offensichtlich der bessere Akzeptor für eine H-Brücke, die von der Scharnierregion ausgeht. Unwahrscheinlich ist, dass das in Wassermoleküle eingebettete Carboxamid der bestimmende Faktor ist, der zu dem veränderten Bindungsmodus führt.

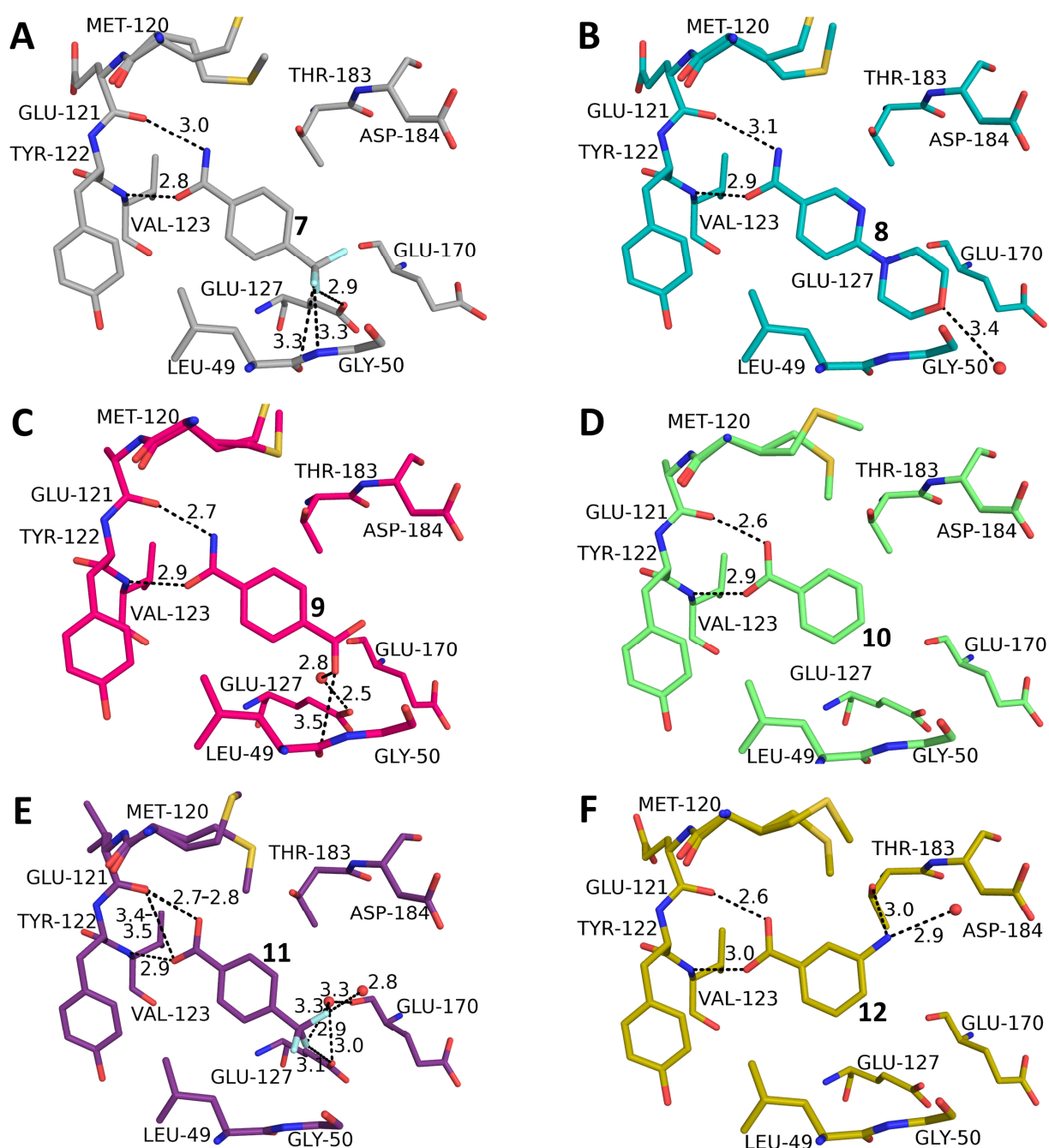


Abbildung 2.2: Überblick über die verschiedenen Liganden, wie sie an die Scharnierregion der PKA binden. (A) 4-(Trifluormethyl)benzamid **7** (6SPS), (B) 6-(Morpholin-4-yl)pyridin-3-carboxamid **8** (6SPY), (C) Terephthalsäuremonoamid/ 4-Carbamoylbenzoesäure **9** (6SOX), (D) Benzoesäure **10** (6SNN), (E) 4-(Trifluormethyl)benzoesäure **11** (6SPM), (F) 3-Aminobenzoesäure **12** (6SPU).

Eine zweite Überraschung ist Fragment **4**, das in der Kristallstruktur mit zwei verschiedenen Orientierungen bindet, entweder über die erwartete Wechselwirkung mit der Carboxamidgruppe, oder aber überraschenderweise über seine Hydroxylfunktion, die sich am entgegengesetzten Ende des Fragments befindet. Die OH-Gruppe (pK_a=8.36) scheint in der Lage zu sein, sowohl als H-Brückendonor wie auch als Akzeptor für die Scharnierregion zu dienen. Dies wird durch den Bindungsmodus des Phenols **5** bestätigt (**Abbildung 2.1 E**). Selbst die Einbettung der Carboxamid-Funktion in den sechsgliedrigen Ring von **6** erlaubt die erwartete zweizählige Wechselwirkung mit der Scharnierregion. Sie erfordert jedoch das Tautomer mit aufgebrochener Aromatizität. Dazu wird der pyridinartige Stickstoff (pK_a=1.33) protoniert und fungiert als H-Brückendonor für den Carbonylsauerstoff des Scharniers.

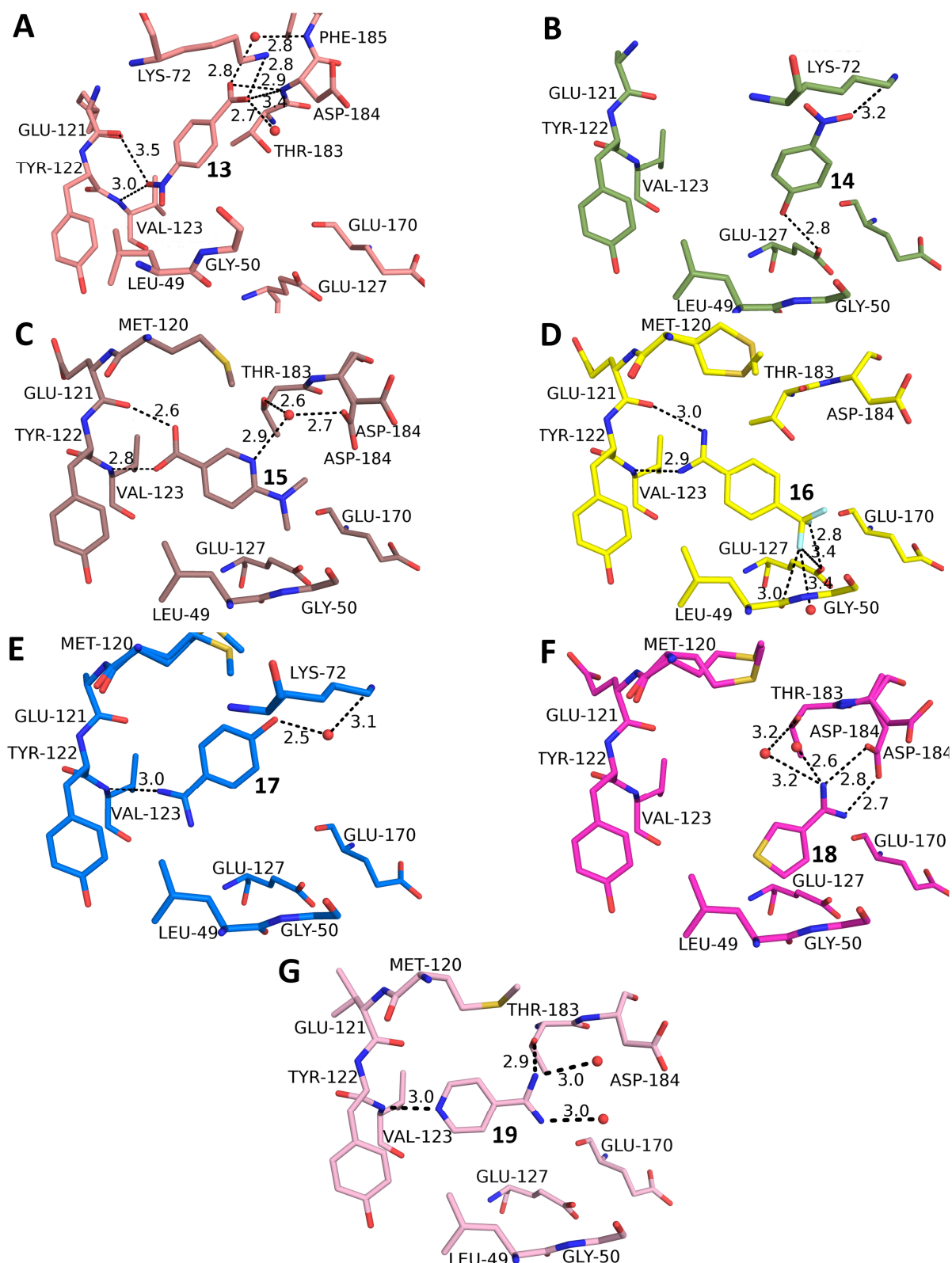


Abbildung 2.3: Überblick über die verschiedenen Liganden, wie sie an die Scharnierregion der PKA binden. (A) 4-Nitrobenzoesäure **13** (5N3J), (B) 4-Nitrophenol **14** (6Z08), (C) 6-Dimethylaminopyridin-3-carbonsäure **15** (5N3E), (D) 4-(Trifluormethyl)benzcarboximidamid **16** (5N3D), (E) 4-Hydroxybenzamidin **17** (6YPS), (F) Thiophen-3-carboximidamid **18** (5N3C), (G) Iso-Nicotinamidin **19** (6ZN0).

Tabelle 2.1: Chemische Formeln, schematischer Bindungsmodus an der Scharnierregion (magenta), gemessene pK_a-Werte in Wasser (Zuordnung farbcodiert), PDB-Codes und kristallographische Auflösung der in diesem Beitrag untersuchten Fragment-Komplexe.

ID	Chemische Formel (Scharnierregion links, magenta)	pK _a - Werte	PDB- Code	Auflösung [Å]	ID	Chemische Formel (Scharnierregion links, magenta)	pK _a - Werte	PDB- Code	Auflösung [Å]
1		< 2 > 12	6SNX	1.40	11		3.48	6SPM	1.37
2		< 2 3.37 > 12	5N3H	1.36	12		3.17 4.56	6SPU	1.39
3		< 2 3.68 > 12	5N3Q	1.31	13		3.20	5N3J	1.12
4		< 2 8.36 > 12	5N3S ^[a]	1.14	14		6.91	6Z08	1.49
5		9.99 ^[b]	6Z44	1.38	15		3.05 6.17	5N3E	1.53
6		1.33 10.43	5N33	1.43	16		10.78	5N3D	1.77
7		< 2 > 12	6SPS	1.65	17		7.75 > 12	6YPS	1.35
8		< 2 3.74 > 12	6SPY	1.60	18		11.32	5N3C	1.77
9		< 2 3.53 > 12	6SOX	1.38	19		2.23 10.12	6ZN0	1.59
10		4.01	6SNN	1.82					

^[a] Zweite Ausrichtung mit Carboxamid-Gruppe zur Scharnierregion.

^[b] Wert aus dem CRC-Handbuch für Chemie und Physik.^[76]

Interessanterweise können auch Benzoessäurederivate als Bindungspartner für die Scharnierregion dienen, sofern sie im neutralen Zustand das erforderliche H-Brücken-Donor/Akzeptor-Muster annehmen (**10**, **11**, **12**, **15**, **Abbildung 2.2** und **Abbildung 2.3**). In diesem Protonierungszustand bilden sie ein Bindungsmuster aus, das der Carboxamidgruppe sehr ähnlich ist. Die Bindungsgeometrien der Benzoessäure **10** (**Abbildung 2.2 D**) und Benzamid **1** (**Abbildung 2.1 A**) sind praktisch identisch. In wässriger Lösung liegen die pK_a-Werte der hier untersuchten Säuren in einem Bereich zwischen 3-4, so dass die neutrale Form in wässriger Lösung auch die wahrscheinlichste Form in der Bindungstasche ist.

Überraschenderweise fällt die *p*-Nitrobenzoessäure **13** (**Abbildung 2.3 A**) völlig aus diesem Muster heraus. Obwohl ihr pK_a-Wert im gleichen Bereich liegt (3.20), zieht es das Fragment vor, mit der Scharnierregion über seine Nitrogruppe nur einzähnig zu interagieren. Auf den ersten Blick scheint dies eher ungewöhnlich, da die Nitrogruppe bekanntlich ein schlechterer H-Brückenakzeptor ist als die Carbonsäure. Dennoch ist eine ganze Reihe von Protein-Ligand-Komplexen bekannt, bei denen die Nitrogruppe an einer H-Brücke beteiligt ist. In der PDB konnten 506 Wechselwirkungen dieser Art gefunden werden (Details siehe **Abschnitt 2.6**), wobei neben **13** ein weiterer Ligand über eine H-Brücke an die Scharnierregion einer Kinase bindet (PDB-Code: 2W7X). Im Komplex mit **13** wird die gegenüberliegende Carboxylatgruppe in eine Position gebracht, in der sie eine ladungsunterstützte Wechselwirkung mit der Ammoniumgruppe von Lys72 eingehen kann. Wir gehen daher von einer Deprotonierung der Säuregruppe aus. Damit wird die Ausbildung einer Salzbrücke zu Lys72 die treibende Kraft, um den Protonierungszustand dieser Gruppe in den deprotonierten Zustand zu verschieben. Es entsteht eine energetisch begünstigte Salzbrücke. Basierend auf diesen Erfahrungen haben wir Nitrophenol **14** getestet (**Abbildung 2.3 B**). Es weist die Nitrogruppe auf, es fehlt aber eine gegenüberliegende Funktion, die leicht deprotoniert werden kann (pK_a=6.91), um einen ladungsunterstützten Kontakt zu Lys72 herzustellen. Infolgedessen vermeidet **14** jeglichen Kontakt mit der Scharnierregion, ganz anders als **4** und **5**. Stattdessen platziert **14** seine Nitrogruppe neben Lys72, erreicht dadurch aber nur eine sehr lange Wasserstoffbrücke mit kaum idealer Geometrie.

Das vielleicht überraschendste Ergebnis stellt der Bindungsmodus des Benzamidinderivats **16** dar (**Abbildung 2.3 D**). Aromatische Amidine sind die typischen Gruppen, die aufgrund ihrer hohen pK_a -Werte, die weit über 12 liegen, häufig zur Interaktion mit Asp oder Glu in Proteinen verwendet werden. Liganden, die mit elektronenziehenden Gruppen am aromatischen Teil ausgestattet sind, können jedoch wie **16** niedrigere pK_a -Werte (hier 10.78) aufweisen. Dies ermöglicht dem Molekül, mit einer ungeladenen Amidinofunktion an die Scharnierregion zu binden und dann das erforderliche H-Brücken-Donor/Akzeptor-Muster aufzuweisen. In diesem Zustand nimmt das Benzamidinfragment den gleichen Bindungsmodus an wie die Benzoessäurederivate (z. B. **10-12, 15**), ein mehr als überraschender und definitiv unerwarteter bioisosterer Ersatz! Eine Analyse der in der PDB verfügbaren Strukturen zeigt, dass alle an ein aromatisches Ringsystem gebundenen Amidinogruppen als Wasserstoffbrückendonoren fungieren, wenn sie an ein Protein gebunden werden.

Diese Beobachtung regte uns an, weitere aromatische Amidine zu untersuchen. Die Fragmente **17** und **18** weisen höhere pK_a -Werte für die Amidinofunktion auf. **17** (**Abbildung 2.3 E**) kontaktiert die Scharnierregion einzähnig, sehr ähnlich wie die *p*-Nitrobenzoessäure **13**. Fragment **18** vermeidet es völlig, mit dem Scharnier zu interagieren. Stattdessen rekrutiert es die Carboxylatgruppe von Asp184, um eine Salzbrücke zu bilden. Wir nehmen an, dass dies die treibende Kraft für die Bildung dieses Bindungsmodus darstellt.

Ein interessanter Fall ist wiederum Fragment **19**, da es eine Amidinogruppe aufweist, die noch weniger basisch ist als die in **16** ($pK_{a(19)}=10.12$; $pK_{a(16)}=10.78$). Dennoch kontaktiert **19** das Scharnier nicht über ein H-Brücken-Donor/Akzeptor-Muster wie **16**, sondern verwendet seinen pyridinähnlichen Stickstoff ($pK_a=2.23$), um eine H-Brücke von der Scharnierregion aufzunehmen, ähnlich wie Fragment **2**. Hier ist der angenommene Protonierungszustand der Amidinogruppe schwer abzuschätzen. Da die Gruppe jedoch nur drei ziemlich lange H-Brücken ausbildet, erscheint der ungeladene Zustand sehr wahrscheinlich. Wie bei **2** ist das bestimmende Merkmal für den eingenommenen Bindungsmodus von **19** die über den pyridinartigen Stickstoff eingegangene Wechselwirkung. Im Gegensatz dazu verfügt Fragment **16**, das einen ähnlichen pK_a -Wert besitzt, nur über die Amidinogruppe zur Bildung von H-

Brücken. Die Präferenz von **19** für die Wechselwirkung des pyridinartigen Stickstoffs mit der Scharnierregion stimmt mit der für **2** gefundenen Situation überein. Interessanterweise führten mehrere Arzneimittelentwicklungen dazu, dass ein Stickstoff vom Pyridintyp als einzige Wechselwirkungsgruppe zur Bindung an die Scharnierregion verwendet wird (z. B. Lapatinib, Gefitinib, Erlotinib, Vandetinib, Tanduinib, SB202190, SB203580).^[77,78] Möglicherweise ist ein einzelner Kontakt zur Interaktion mit der Scharnierregion vorteilhaft im Vergleich zu einer überfrachteten mehrfachen Substitution mit nahe beieinander stehenden funktionellen Gruppen am Liganden. Es sollte nicht vergessen werden, dass ein zweizähniges H-Brückenmuster aus Donor- und Akzeptorfunktionen auf gegenüberliegenden Seiten der interagierenden Moleküle immer zu abstoßenden sekundären Wechselwirkungen führt, die die ausgebildeten Wasserstoffbrücken schwächt. Diese Beobachtung wurde erstmals von ZIMMERMAN et al.^[79] auf dem Gebiet der Wirt-Gast-Chemie beschrieben. Es spielt jedoch auch bei Protein-Ligand-Interaktionen eine Rolle, wie wir vor einiger Zeit für die Ligandbindung an ein tRNA-modifizierendes Enzym zeigen konnten.^[80]

2.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Studie die Merkmale der ATP-Bindetasche der bekannten Kinase PKA ausleuchtet, indem sie für eine Reihe von Fragmenten die Wechselwirkungen mit der Scharnierregion des Enzyms untersucht. Das Peptidrückgrat der *Hinge*-Region stellt ein Muster von H-Brücken-Donor/Akzeptor-Funktionen bereit, das von einem potentiellen Liganden erwidert werden muss. Daher erscheinen Liganden, die eine Gruppierung von nahe beieinander liegenden Donor- und Akzeptorgruppen aufweisen auf den ersten Blick ideal. Funktionelle Gruppen wie z. B. ein Carboxamid, eine Carbonsäure, aber auch eine Amidinogruppe im ungeladenen Zustand erfüllen das geforderte Muster. Das verbleibende Molekül muss lediglich mit geeigneten elektronenschiebenden oder -ziehenden Gruppen dekoriert werden, um den erforderlichen Protonierungszustand zu gewährleisten. Ein solches Design erfordert jedoch eine exakte Kontrolle der pK_a-Eigenschaften eines Moleküls. Aufgrund von Polarisierungseffekten in der Bindungstasche können pK_a-Werte, die in wässriger Lösung definiert sind, leicht um mehrere Größenordnungen verschoben werden (vgl. den oben erwähnten Trypsin-Anilin-Fall^[66]). Dies macht solche Vorhersagen extrem schwierig. Darüber hinaus beobachteten wir, dass einige überraschende Bindungsmodi resultieren, die besondere

Eigenschaften einer Bindungstasche ausnutzen. So können funktionelle Gruppen, die hinsichtlich ihrer pK_a-Werte ähnlich sind, dennoch mit unterschiedlichen Protonierungszuständen in einem anderen lokalen Bereich der Tasche binden (z. B. **13**, **18**, **19**). Insbesondere ein pyridinähnlicher Stickstoff im Liganden kann zu überraschenden Änderungen des Bindungsmodus führen, was sich vermutlich durch die Bevorzugung einer einfachen Wasserstoffbrücke zur *Hinge*-Region unter der Vermeidung abstoßender sekundärer Wechselwirkungen erklären lässt. Diese treten aber zwangsläufig bei gegenüberliegenden zweizähligen Wasserstoffbrücken-Kontakten auf.

2.5 Detaillierte Beschreibung der Strukturen

Bevor alle Kristallstrukturen im Detail beschrieben werden, wird eine kurze Zusammenfassung der Wasserstrukturen in den Komplexen gegeben. Im Vergleich zum Apoenzym (5MOU) mit drei Wassermolekülen in der Nähe der Scharnierregion liegt in den meisten Strukturen eine Verdrängung dieser Wassermoleküle durch die Scharnierregion-bindenden Liganden vor: In den Strukturen **3**, **4**, **6**, **12**, **15**, **16**, **17** und **19** (**Abbildung 2.1-Abbildung 2.3**) befindet sich nahe der Aminosäuren Thr183 und Asp184 ein Wassermolekül, das Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand vermittelt. Eine Ausnahme bildet Ligand **16**, der mit diesem Wassermolekül nicht interagiert. In drei Strukturen (**6**, **11**, **19**) sehen wir keine komplette Verdrängung, aber eine leichte Verschiebung eines Wassermoleküls, das mit Glu127 in der Apostruktur interagiert. Ligand **18** bindet nicht direkt an die Scharnierregion, sodass die beiden in der Apostruktur vorhandenen Wassermoleküle nicht verschoben werden. Für alle anderen Kristallstrukturen, die in dieser Studie beschrieben werden, können keine konservierten Wassermoleküle gefunden werden.

Wir haben zunächst Benzamid (**1**) mit der PKA kristallisiert, um das durch die Scharnierregion gegebene H-Brückenbindungsmuster zu ergänzen (**Abbildung 2.1 A**). Benzamid interagiert mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von Glu121 (2.9 Å) und dem Rückgrat-Stickstoff von Val123 (2.9 Å) des Scharniermotivs. Der Amidstickstoff ist ebenfalls in der Lage, über eine lange H-Brücke (3.1 Å) mit einem von zwei Konformeren (Besetzung: 47%) der Thr183-Seitenkette zu interagieren. Da die pK_a-

Werte von **1** unter 2 und über 12 liegen (**Tabelle 2.1**), kann unter den angewandten *Soaking*-Bedingungen von einem ungeladenen Zustand dieses Liganden ausgegangen werden.

Nicotinamid (oder Pyridin-3-carboxamid, **2**, **Abbildung 2.1 B**) verwendet überraschenderweise seinen Pyridinstickstoff, um mit dem Scharnierregion-Stickstoff von Val123 (2.9 Å) als Wasserstoffbrückenakzeptor ($pK_a = 3.37$) zu interagieren. Als zweiter Kontakt zur Scharnierregion ist der Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von Glu121 wasservermittelt an der H-Brücke zum Amid-Stickstoff von **2** beteiligt. Zusätzlich verbindet der Carbonyl-Sauerstoff die Scharnierregion mit dem DFG-Motiv der Kinase über Thr183Oγ (2.7 Å). Die gut definierte Elektronendichte und die verfeinerten B-Werte zeigen, dass die Restmobilität des Fragments auf dem Pyridin-Teil des Liganden viel geringer ist als auf dem Carboxamid-Teil (Pyridin-Stickstoff: 15 Å²; Carbonyl-Sauerstoff: 29 Å²; Durchschnitt: 21 Å²).

3-Aminobenzamid (**3**, **Abbildung 2.1 C**) interagiert ähnlich wie **1** direkt mit dem Scharniermotiv unter Ausbildung des erwarteten Musters. Die Carboxamidgruppe zeigt mit zwei parallelen H-Brücke in Richtung des Rückgrat-Carbonylsauerstoffs von Glu121 und des Rückgrat-Stickstoffs von Val123. Die Abstände betragen 2.9 Å für beide H-Brücken. Die exocyclische Aminogruppe von **3** befindet sich in einem Abstand von 3.1 Å zur Hydroxylgruppe von Thr183 und bildet mit diesem eine weitere H-Brücke aus. Die Elektronendichte des Fragments ist klar definiert (12.4 σ ($F_o - F_c$)). Die Variation der B-Werte über **3** ist gering, von 10.0 Å² (Benzen-Kohlenstoff neben der Amidgruppe) bis 14.0 Å² (Aminogruppe).

4-Hydroxybenzamid (**4**, **Abbildung 2.1 D**) nimmt zwei alternative Orientierungen in der ATP-Bindetasche ein (Orientierung A, Amidgruppe zeigt zur Scharnierregion; B, Hydroxylgruppe zeigt zur Scharnierregion). In beiden Orientierungen interagiert **4** mit der Scharnierregion. Orientierung A verwendet ähnlich wie **1** und **3** die Carboxamidgruppe, um zwei parallele H-Brücken mit dem Rückgrat-Stickstoff von Val123 und dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von Glu121 zu bilden. In Orientierung B dient die phenolische Hydroxygruppe, ähnlich dem Bindungsmodus von Phenol (**5**) (**Abbildung 2.1 E**), gleichzeitig als H-Brückenbindungsdonor und -akzeptor für den Rückgrat-Carbonylsauerstoff von Glu121 und den Rückgrat-Stickstoff von Val123. Die Hydroxylgruppe ist zu beiden Rückgrat-Atomen in

einem Abstand von 2.7 Å lokalisiert, während die Heteroatome der Carboxamidgruppe jeweils einen Abstand von 3.0 Å aufweisen. In Orientierung B kontaktiert die Carboxamidgruppe die DFG-Schleife mit einer H-Brückenbindung (2.6 Å) über Thr183 und einer zweiten wasservermittelte Wechselwirkung mit dem Carboxylsauerstoff von Glu170. Die Carboxamidgruppe interagiert außerdem wasservermittelt mit Glu127. Dieses Wassermolekül befindet sich in einem Abstand von je 3.1 Å zu beiden H-Brückenbindungspartnern. Im Gegensatz dazu ist die phenolische Hydroxylgruppe in Orientierung A in die Ribosetasche orientiert und interagiert über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylatgruppe von Glu127 und mit dem Rückgrat-Carbonylsauerstoff von Leu49. Die verfeinerten Besetzungen ergaben, dass Orientierung A zu 60% und Orientierung B zu 40% verliert.

Im Gegensatz zu einer zuvor bestimmten Struktur von Phenol (**5**) mit der humanem PKA beobachteten wir nur ein Phenolmolekül, das an die CHO PKA gebunden ist (**Abbildung 2.1 E**). Dieses interagiert mit der Scharnierregion in der oben beschriebenen Weise mit Glu121C=O (2.7 Å) und Val123NH (2.8 Å). Der pK_a-Wert aus der Literatur^[76] legt nahe, dass unter den angewandten *Soaking*-Bedingungen das Gleichgewicht auf Seite der ungeladenen Spezies liegen sollte. Dies stimmt mit dem beobachteten Interaktionsmuster überein, da Phenol als Donor und Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen fungiert.

Je nachdem, ob das aromatische Tautomer oder das mit einer endocyclischen Amidbindung betrachtet wird, enthält Fragment **6** im letzteren Tautomer ebenfalls ein Motiv, das einem Carboxamid-Anteil ähnelt (**Abbildung 2.1 F**). Dabei bindet es an der Scharnierregion, indem die Amido-N-H-Gruppe eine H-Brücke zu Glu121C=O (2.8 Å) ausbildet. Der benachbarte Amid-Carbonylsauerstoff dient als H-Brückenakzeptor in der Bindung mit Val123NH (2.9 Å). Ebenfalls benachbart liegt die exocyclische Aminogruppe, welche mit einem Wassermolekül in der Bindungstasche interagiert. Die Trifluormethylgruppe, welche an der gegenüberliegenden Seite des Rings substituiert ist, orientiert sich in Richtung der DFG-Schleife. Sie steht nicht in direktem Kontakt mit dieser Schleife. Eines der Fluoratome interagiert jedoch wasservermittelt (3.1 Å) mit dem Rückgrat-Stickstoffatom von Asp184 der DFG-Schleife. Die B-Werte deuten auf eine höhere Restmobilität der Trifluormethylgruppe

(22.8 Å²) im Vergleich zum restlichen Teil von Fragment **6** hin (Durchschnitt ohne Berücksichtigung der Trifluormethylgruppe: 18.8 Å²).

Die Amidgruppe von **7** interagiert mit dem üblichen Muster (**Abbildung 2.2 A**) mit der Scharnierregion über Glu121C=O (3.0 Å) und Val123NH (2.8 Å). Die gemessenen pK_a-Werte deuten darauf hin, dass **7** im ungeladenen Zustand an die Kinase bindet. Darüber hinaus interagiert die *para*-Trifluormethylgruppe durch polare Kontakte mit der Seitenkette von Glu127 (2.9 Å) und dem Rückgrat Carbonylsauerstoff (3.3 Å). Die Trifluormethylgruppe zeigt eine hohe Mobilität im Vergleich zum restlichen Teil des Fragments **7** (B-Werte: Kohlenstoff der Trifluormethylgruppe 24.2 Å², Kohlenstoff des Carboxamids 12.9 Å²).

Bei einem pK_a-Wert von 3.74 bindet **8** höchstwahrscheinlich ungeladen an die Kinase (**Abbildung 2.2 B**). Es bildet mit seiner Carboxamidgruppe die üblichen Wechselwirkungen mit der Scharnierregion (Glu121C=O, 3.1 Å und Val123NH 2.9 Å) aus. Der angefügte sechsgliedrige Morpholinring interagiert schwach über seinen Ethersauerstoff mit einem Wassermolekül (3.4 Å).

Fragment **9** hat neben der Carboxamidgruppe eine, in *para*-Stellung befindliche Carboxylatfunktion. Für die Wechselwirkung mit der Scharnierregion verwendet **9** höchstwahrscheinlich sein Carboxamid, wodurch das übliche Interaktionsmuster entsteht (**Abbildung 2.2 C**, Glu121C=O, 2.7 Å und Val123NH 2.9 Å). Aus topologischen Gründen wäre auch eine Interaktion der protonierten Säurefunktion mit der Scharnierregion denkbar. Die Carboxamidgruppe stünde in diesem Fall in Richtung der Positionen von Glu127 und Glu170. Allerdings wurde die zuerst genannte Orientierung hauptsächlich durch den Vergleich der verfeinerten B-Werte aller Sauerstoffatome und dem des Stickstoffs gewählt. Beide Sauerstoffatome der Carboxylgruppe weisen nahezu identische B-Werte auf, weshalb die gewählte Orientierung im Modell richtig gewählt sein sollte (Sauerstoffatome an der Carboxylgruppe: 31.0 Å² und 31.0 Å², Sauerstoff an der Carboxamidgruppe 17.8 Å², Stickstoff 19.1 Å²). Im Vergleich zu **8** ist der Abstand zur Carbonylgruppe des Proteins kürzer. Möglicherweise korreliert dies mit dem stärkeren elektronenziehenden Effekt der *para*-positionierten Säuregruppe. Zwei weitere Interaktionen gehen

von der Carboxylatgruppe aus, die schwach (3.5 Å) mit dem Rückgrat-Carbonylsauerstoff von Gly50 interagiert und weiterhin einen wasservermittelten Kontakt zu Glu127 (2.5-2.8 Å) ausbildet. Bei einem gemessenen pK_a -Wert von 3.53 in wässriger Lösung konnte der Ligand dennoch mit der protonierten Säuregruppe an die Proteine binden und ist als Ergebnis einer starken pK_a -Verschiebung in der Proteinumgebung zu betrachten. Für das Fragment **9** sei angemerkt, dass die gewählte Orientierung aufgrund der Längen der Wasserstoffbrückenbindungen auch in einer umgekehrten Weise gewählt werden könnte, da diese eher mit den Abständen der Carbonsäure-Derivaten (**10-12**) übereinstimmt. Allgemein scheinen die Abstände für Carbonsäuren an der Scharnierregion in unseren Untersuchungen etwas kürzer zu sein (2.6-2.8 Å zu Glu121C=O), als dies für die Carbonsäureamid-Derivate (2.9-3.1 Å) der Fall ist. Somit würde **9** eine leichte Abweichung zu den weiteren Carbonsäureamid-Derivaten darstellen, da auch hier eine vergleichsweise kürzere Länge (2.7 Å zu Glu121C=O) beobachtet wird. Die tatsächliche Orientierung kann daher nicht abschließend bestimmt werden.

In Anbetracht des schwach sauren Charakters von Benzoessäuren kann eine Bindung im ungeladenen Zustand an das Protein nicht ausgeschlossen werden. Daher haben wir die Bindung von Benzoessäure (**10**, pK_a -Wert=4.01) getestet, und bemerkenswerterweise interagiert sie bei identischer Wechselwirkungsgeometrie wie die Carboxamidderivate mit der Scharnierregion (**Abbildung 2.2 D**). Dieses Wasserstoffbrückenbindungsmuster kann nur realisiert werden, wenn die Carbonsäurefunktion als Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor dient und mit dem Carbonylsauerstoff von Glu121 (2.6 Å) und dem Rückgrat-Stickstoff von Val123 (2.9 Å) im üblichen Muster interagiert. Obwohl der pK_a -Wert der Benzoessäure eine vollständige Deprotonierung in wässriger Lösung vor der Bindung an das Protein suggeriert, muss sie bei der Bindung ein Proton aufnehmen, was formal einer starken pK_a -Verschiebung bei der Bindung entspricht. Dies wird unterstützt durch das Ergebnis in **9**, welches mit seiner Carboxamid- und Carbonsäure-Gruppe beide Funktionalitäten im gleichen Molekül aufweist und vermutlich das permanent ungeladene Carboxamid für die Wechselwirkung mit der Scharnierregion bevorzugt. Wahrscheinlich muss bei **10** der energetische Beitrag für die Aufnahme eines Protons bei der Bindung aufgebracht werden, um das Fragment an dem Scharnier unterzubringen.

Die Benzoesäure **11**, in *para*-Stellung durch eine Trifluormethylgruppe substituiert, bindet auf die gleiche Weise wie die unsubstituierte Säure (**Abbildung 2.2 E**). Darüber hinaus dient die Säuregruppe als Donor (2.7-2.8 Å) und Akzeptor (2.9 Å) für den Kontakt zur Scharnierregion. Weiterhin interagiert die elektronenziehende Trifluormethylgruppe mit Glu127 (3.2 Å) und wasservermittelt mit Glu170, ähnlich wie das in der Struktur mit dem analogen Carboxamid-Derivat **7** beobachtet wird. Darüber hinaus gibt es eine schwache Wechselwirkung mit einem Wassermolekül in einem Abstand von 3.4 Å. Die angefügte Trifluormethylgruppe verschiebt den pK_a-Wert des ungebundenen Fragments **11** zu 3.48, was möglicherweise zu etwas längeren H-Brückenbindungen an die Scharnierregion im Vergleich zur unsubstituierten Benzoesäure (**10**) führt. Ähnlich wie bei **7** ist der B-Wert des zentralen Kohlenstoffatoms der Carboxylfunktion wesentlich niedriger als der der Trifluormethylgruppe (B-Werte: Kohlenstoffatom der Carbonsäure: 14.9 Å², Kohlenstoffatom der Trifluormethylgruppe: 21.9 Å²).

Das Hinzufügen einer exocyclischen Aminogruppe in meta-Position zur Benzoesäure verändert die Bindungsposition nicht (**Abbildung 2.2 F**). Die Carbonsäurefunktion von **12** interagiert als Donor und Akzeptor mit der Scharnierregion (Glu121C=O: 2.6 Å, Val123NH 3.0 Å). Die meta-ständige Aminogruppe interagiert mit der Seitenkette von Thr183 (3.0 Å) und einem Wasser (3.0 Å). Entgegen der von **12** in wässriger Lösung gemessenen, niedrigen pK_a-Werte von 3.17 und 4.56, deutet das Interaktionsmuster auf eine Bindung im ungeladenen Zustand hin.

4-Nitrobenzoesäure (Fragment **13**, pK_a=3.20) nimmt einen ziemlich überraschenden Bindungsmodus an (**Abbildung 2.3 A**). Die Carboxylatgruppe von **13** sollte aufgrund der starken elektronenziehenden Wirkung der *para*-NO₂-Gruppe einen eher sauren Charakter aufweisen. Infolgedessen weist das Fragment wahrscheinlich nur Akzeptor-Funktionalitäten gegenüber dem Protein auf. Daraus könnte resultieren, dass **13** mit seiner Nitrogruppe an die Scharnierregion bindet. Ein Sauerstoffatom der Nitrogruppe interagiert direkt mit dem Rückgrat-Stickstoff von Val123 (3.0 Å). Die gegenüberliegende Carbonsäuregruppe interagiert mit drei verschiedenen Proteinresten. Die terminale Ammoniumgruppe der Seitenkette von Lys72 bildet eine Salzbrücke mit **13** (2.8 Å) und unterstreicht

noch mehr, dass die Carboxylatgruppe im deprotonierten Zustand vorliegt. Vermittelt durch ein Wassermolekül interagiert der zweite Carboxylat-Sauerstoff mit dem Rückgrat-Stickstoff von Phe185, der Teil des DFG-Motivs ist. Als dritter Interaktionspartner bildet der Rückgrat-Stickstoff von Asp184 eine H-Brückenbindung zu der Carboxylatgruppe (2.9 Å, nicht dargestellt) aus. Zusätzlich nimmt die Seitenkette von Met120 eine alternative Orientierung ein, die das Schwefelatom der Seitenkette in einem Abstand von 3.1 Å zum Carboxylat-Sauerstoff platziert. Fragment **13** zeigt konsistente B-Faktor-Werte für alle Atome. Um die Säure- und Nitrogruppen von **13** richtig zu lokalisieren, verglichen wir die Dichte-Peaks der Zentralatome beider Gruppen. Der Peak der höheren Elektronendichte ermöglichte die Platzierung der Nitrogruppe. Die Kristallstruktur zeigt eine außergewöhnlich hohe Auflösung von 1.12 Å, weshalb wir mit unserer Zuordnung zuversichtlich sind.

Interessanterweise vermeidet das Fragment **14** (Nitrophenol, **Abbildung 2.3 B**) den Kontakt mit der Scharnierregion, obwohl die Hydroxyfunktion des verwandten Phenols (**5**) eine solche Interaktion herstellt. Stattdessen bindet hier **14** mit seiner Hydroxyfunktion an die Carboxylatgruppe von Glu127 (2.9 Å). Offensichtlich bindet dieser Ligand, der in Wasser einen pK_a-Wert von 6.91 aufweist, ungeladen an das Protein. Die Nitrogruppe kontaktiert die Ammoniumgruppe von Lys72 über eine schwache Interaktion (3.2 Å).

Fragment **15** ist wieder eine Benzoesäure, nur mit einem Dimethylaminosubstituenten in *para*-Position als elektronenschiebende Gruppe (**Abbildung 2.3 C**). Außerdem enthält sein aromatischer Ring einen Pyridin-Stickstoff. Die Carbonsäure muss in protonierter Form vorliegen und stellt das übliche Donor-/Akzeptor-Wasserstoffbrückenbindungsmuster zu Glu121C=O (2.6 Å) und Val123NH (2.8 Å) her. Darüber hinaus interagiert der Pyridin-Stickstoff wasservermittelt mit Thr183O γ und in einer Orientierung (Besetzung: 44%) mit der Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp184. Über diesen Kontakt verbindet **15** die Scharnierregion mit der DFG-Schleife. Die tertiäre Aminogruppe hat keinen direkten Interaktionspartner und orientiert sich in Richtung der Öffnung der Bindetasche.

Fragment **16** nimmt genau die gleiche Bindestellung ein wie **15** (**Abbildung 2.3 C und D**), obwohl **16** ein Benzamidin und **15** eine Benzoessäure ist. Dieser, auf den ersten Blick erstaunliche bioisostere Ersatz erklärt sich durch die Substituentenmuster beider Liganden. Beide funktionellen Gruppen liegen im ungeladenen Zustand vor und weisen ein Donor-/Akzeptormuster für die Interaktion mit dem Scharniermotiv auf. Eines der Amidin-Stickstoffatome interagiert mit dem Rückgrat-Stickstoff von Val123 als H-Brückenbindungsakzeptor (2.9 Å). Das Zweite wirkt als H-Brückenbindungs-Donor und wechselwirkt mit dem Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoff von Glu121 (3.0 Å). Normalerweise haben Amidine einen stark basischen Charakter mit pK_a-Werten weit über 12. Die Trifluormethylgruppe reduziert jedoch den basischen Charakter durch ihren -I-Effekt, was zur Bindung von **16** im ungeladenen Zustand führt. Dementsprechend wird ein pK_a-Wert von 10.78 in Wasser für **16** gemessen. Zwei der Fluoratome stehen in engem Kontakt mit dem Protein und zeigen ganz ähnliche Geometrien wie die anderen Trifluormethyl-haltigen Fragmente **7** und **11**. Ein Vergleich der B-Werte dieser beiden Fragmente mit **16** zeigt den gleichen Trend, sodass die Trifluormethylgruppe wesentlich höhere Werte aufweist als die Gruppe, die an die Scharnierregion bindet (Kohlenstoffatom der Trifluormethylgruppe: 48.6 Å², Kohlenstoffatom der Carboximidamid-Gruppe: 28.3 Å²).

Fragment **17** bindet mit seiner Amidinogruppe an die Scharnierregion (**Abbildung 2.3 E**), jedoch wird nur ein Stickstoff verwendet, um mit dem Val123NH in einem Abstand von 3.0 Å zu interagieren. Sollte trotz des größeren Abstands eine richtige H-Brücke ausgebildet werden, so muss die Amidinofunktion im ungeladenen Zustand vorliegen. Nur dann kann die Gruppe als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor wirken, wenngleich der pK_a-Wert jenseits von 12 für dieses Fragment in wässriger Lösung ist. Es ist überraschend, dass ein abweichender Bindungsmodus im Vergleich zu **16** angenommen wird, obwohl beide Fragmente anscheinend den gleichen Protonierungszustand aufweisen. Die zusätzliche *para*-Hydroxygruppe von **17** (pK_a-Wert=7.75) interagiert über ein Wassermolekül (2.5 Å) mit Lys72 (3.1 Å).

Fragment **18** (**Abbildung 2.3 F**) zeigt eine Amidinogruppe mit einem basischen pK_a-Wert von 11.32 in wässriger Lösung. Wahrscheinlich bindet **18** im geladenen Zustand an das Protein und vermeidet den

Kontakt mit der Scharnierregion. Die Protonierung der Amidinogruppe wird durch die Beobachtung unterstützt, dass **18** mit der Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp184 (Teil des DFG-Motivs) eine Salzbrücke bildet und Abstände von 2.8 und 2.7 Å beobachtet werden. Fragment **18** ist zu 69% in der Bindetasche besetzt.

Schließlich untersuchten wir *iso*-Nicotinamidin **19** (**Abbildung 2.3 G**). Auch dieses Fragment enthält eine Amidinogruppe mit einem pK_a-Wert von 10.12. Bemerkenswert ist auch, dass diese funktionelle Gruppe nicht, wie im Fall von **16** und **17** in Richtung der Scharnierregion exponiert ist. Stattdessen verwendet es, ähnlich wie **2** (**Abbildung 2.1 B**), den endocyclischen Pyridin-Stickstoff (pK_a-Wert=2.23), um eine H-Brückenbindung zu Val123NH der Scharnierregion in einem Abstand von 3.0 Å auszubilden. Die entgegengesetzte *para*-Amidino-Gruppe fungiert als ein H-Donor in der H-Brückenbindung zu Thr183O_y (2.9 Å). Damit unterscheidet sich **19** von **18**, welches ebenfalls die Amidinogruppe in diesem Bereich orientiert, aber Asp184 als Interaktionspartner wählt. Im Gegensatz zu **2** ist Fragment **19** räumlich gedreht und bildet zwei H-Brückenbindungen zu Wassermolekülen aus, die sich im Vergleich zum Komplex mit **2** an anderen Positionen befinden. Der Protonierungszustand der Amidinogruppe ist schwer abzuschätzen. Da jedoch drei H-Brücken von mittlerer Entfernung vorhanden sind, erscheint der ungeladene Zustand wahrscheinlich. Ähnlich wie bei Fragment **2** deuten die verfeinerten B-Werte auf eine geringere Restmobilität des Fragments neben dem Pyridin-Anteil hin (z.B. Pyridin-Stickstoff: 17.4 Å²; Amidino-Stickstoffe: 22.6 und 23.6 Å²; Durchschnitt für alle Atome von **19**: 19.6 Å²).

2.6 Proteindatenbank-Analyse

Eine Analyse aller Strukturen in der PDB mit dem GeoMine-Programm (Beschreibung in **Abschnitt 2.7**) wurde durchgeführt, um einen Überblick über die in diesem Kapitel gefundenen Wechselwirkungen für eine Nitrogruppe, die an ein aromatisches Ringsystem gebunden ist, verglichen mit dem Auftreten einer solchen Wechselwirkung, die im Allgemeinen in der PDB vorhanden ist, zu erhalten. 506 Übereinstimmungen wurden in 399 Proteintaschen und 214 PDB-Einträgen gefunden. Auf den ersten Blick könnten Liganden unter diesen Übereinstimmungen in vier Fällen als Donor und in 501 Fällen als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen fungieren. Aus einer rein visuellen Untersuchung dieser

Donoren bleibt unklar, ob sie wirklich als H-Donor dienen. Weiterhin ist nicht ersichtlich, ob möglicherweise die entsprechende funktionelle Gruppe des Proteins den Protonierungszustand verändert hat. Eine Verfeinerung dieser Suche ergab zwei Strukturen (2W7X und 5N3J, wobei letzteres **13** aus dieser Arbeit entspricht) in denen Liganden mit ihrer Nitrogruppe Wasserstoffbrückenbindungen zur Scharnierregion einer Kinase ausbilden. Für eine ähnliche Analyse von Amidinen, die an ein aromatisches System gebunden sind, ergab die Suche 513 Interaktionen, die in 282 Proteintaschen und 246 PDB-Einträgen vorhanden sind. Beide Amidinstickstoffe wurden als identisch betrachtet und dienten in allen Fällen als H-Donor in Wasserstoffbrückenbindungen. Wie im obigen Nitro-Beispiel sollten wir mit den erhaltenen Interaktionsstatistiken vorsichtig sein, da der Algorithmus Liganden z.B. in dimeren Proteinen auflisten könnte, die infolge doppelt gezählt würden und diese zu redundanten Informationen zusammenfassen würde. Es könnte daher aussagekräftiger sein, die Anzahl der PDB-Einträge zu vergleichen, in welchen die spezifischen Interaktionen gefunden wurden. Darüber hinaus ist es fraglich, ob der GeoMine-Algorithmus die funktionelle Gruppe eines Liganden, die entweder als H-Brückenbindungsdonor oder -akzeptor dienen kann, korrekt vorhersagt. Ein ähnliches Problem könnte die Zuordnung von Protonierungszuständen für Seitenketten wie His, Asp, Glu, Tyr oder Lys darstellen.

2.7 Experimentelle Durchführung

Kristallisation und *Soaking*

Für die Kristallisation wurde das Protein (0.2 mM) in einen Puffer übertragen, der 100 mM MES/Bis-Tris (pH 6.9), 75 mM LiCl, 0.03 mM Mega8, 1 mM DTT und 0.1 mM Natrium-EDTA enthielt. Für die Kristallisation nach dem Verfahren des „sitzenden Tropfen“ wurden je 3 µL der Proteinlösung in eine Vertiefung einer Titerplatte (HAMPTON RESEARCH) pipettiert. Das Reservoir wurde mit 500 µL einer 23% (v/v) Methanol/Wasser-Mischung gefüllt. Zur Initialisierung der Kristallisation wurden alte Apokristalle mit einem Pferdehaar zerstört und die erhaltenen Kristallbruchstücke als Impfkristalle in die neuen Tropfen überführt. Die Kristalle konnten nach 3 Wochen Wachstum in einen *Soaking*-Puffer überführt werden, der 10% (v/v) des zu untersuchenden Fragments (1 M in DMSO), 30% (v/v) MPD und 60% (v/v) Kristallisationslösung enthielt. Nach 10-20 Minuten wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff

eingefroren und an den *Beamlines* 14.1 (**2**, **4** und **6-16**), 14.2 (**1**, **5** und **19**) und 14.3 (**3**) des BESSY II vermessen.^[81] Weitere *Beamlines*, die zur Datenerfassung verwendet wurden, waren P11^[82,83] am DESY (**17**) und ID23-2 am ESRF (**18**).

Bestimmung der pK_a-Werte

Die pK_a-Werte wurden mit der „SiriusT3 Fast UV pK_a“-Methode bestimmt, die auf der in der Referenz angegebenen spektrophotometrischen (UV-metrischen) Titrationsmethode basiert.^[84] Die zu untersuchende Verbindung wurde als 50 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und eine feste Aliquotierungsgröße von 3 µL wurde zu 1.5 mL Wasser mit 0.15 M KCl als Hintergrundelektrolyt hinzugefügt. Der pH-Wert der verdünnten Probenlösung wurde durch Zugabe von 0.5 M HCl auf pH 2 eingestellt und dann mit einer standardisierten Base (0.5 M Kaliumhydroxid) bei 25°C unter Argonatmosphäre auf pH 12 titriert. Die „SiriusT3 Fast UV pK_a“-Methode verwendet ein proprietäres lineares Puffersystem, das aus der Literatur^[85] adaptiert wurde, um eine wesentlich schnellere Stabilisierung des pH-Wertes nach jeder Titrantzugabe zu erreichen. Während der Titration wurden UV/vis-Spektren in Abhängigkeit von den pH-Messwerten gesammelt. Der pK_a-Wert der Probe wird aus den pH-Messwerten und den gesammelten UV-Spektren berechnet.

Proteindatenbank-Analyse mit dem GeoMine-Programm

Das im Proteins.plus-Server^[86] des Zentrums für Bioinformatik der Universität Hamburg implementierte Programm GeoMine wurde für die Analyse spezifischer, in der PDB vorhandener Interaktionsmuster verwendet: Zunächst wurden innerhalb der PDB Nitrogruppen gesucht, die an ein aromatisches System gebunden sind und Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Protein ausbilden. Innerhalb der Abfrage musste die Definition einer Nitrogruppe hinzugefügt werden, bei welcher der Ligand aus der Struktur mit dem PDB-Code 1DOC als Referenz verwendet wurde. Dabei wurden sowohl die Nitrogruppe als auch das zu dieser Gruppe benachbarte, aromatische Kohlenstoffatom in Bezug auf die Bindungslängen fixiert, um eine an ein aromatisches System gebundene Nitrogruppe zu definieren (SMARTS-Code: [$\$(a1aaaaaa1)$]), da diese funktionelle Gruppe in dem Programm nicht implementiert ist. Einer der beiden äquivalenten Sauerstoffatome wurde als Wasserstoffbrückenbindungspartner

eines Proteinrückgrats oder einer Seitenkette definiert. Dasselbe wurde für die Analyse von Amidinen durchgeführt, sodass eine Amidin-Gruppe benachbart zu einem aromatischen System definiert wurde. Hierbei diene 1ZHR als Referenzstruktur für die Abfrage.

Hinterlegungs-Codes: PKA-Ligand-Komplexe (**ID**, PDB-Code): Benzamid (**1**, 6SNX), Pyridin-3-carboxamid (**2**, 5N3 H), 3-Aminobenzamid (**3**, 5N3Q), 4-Hydroxybenzamid (**4**, 5N3S), Phenol (**5**, 6Z44), 3-Amino-5-(trifluormethyl)-1*H*-pyridin-2-on (**6**, 5N33), 4-(Trifluormethyl)benzamid (**7**, 6SPS), 6-(Morpholin-4-yl)pyridin-3-carboxamid (**8**, 6SPY), 4-Carbamoylbenzoesäure (**9**, 6SOX), Benzoesäure (**10**, 6SNN), 4-(Trifluormethyl)benzoesäure (**11**, 6SPM), 3-Aminobenzoessäure (**12**, 6SPU), 4-Nitrobenzoesäure (**13**, 5N3J), 4-Nitrophenol (**14**, 6Z08), 6-Dimethylaminopyridin-3-carbonsäure (**15**, 5N3E), 4-(Trifluormethyl)benzcarboximidamid (**16**, 5N3D), 4-Hydroxybenzamidin (**17**, 6YPS), Thiophen-3-carboximidamid (**18**, 5N3C), *Iso*-Nicotinamidin (**19**, 6ZN0).

3. Zwei Methoden, ein Ziel: Strukturelle Unterschiede zwischen Kokristallisation und Kristall-*Soaking* zur Findung von Ligand-Bindungsposen

3.1 Einleitende Bemerkungen

Dieses Kapitel basiert auf dem englischen Manuskript, welches für eine Veröffentlichung in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift ChemMedChem diente.^[87] An dieser Arbeit waren DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT, DR. KHANG NGO, PROF. DR. ANDREAS HEINE und PROF. DR. GERHARD KLEBE beteiligt. Mein Anteil war die Aufnahme von jeweils zwei Kristallstrukturen (**21**, **27**) nach dem Kokristallisations- und *Soaking*-Verfahren. Hierzu zählte neben der Proteinexpression und -aufreinigung auch die Kristallisation dieser Komplexe und die Auswertung der Daten. Weiterhin habe ich für die weiteren sechs (**20**, **22-26**), nach dem *Soaking*-Verfahren erhaltenen, PKA-Ligand-Strukturen abschließende Verfeinerungen bis zur Konvergenz des freien R-Wertes gegen einen Testsatz der Daten durchgeführt und diese anschließend in der PDB-Datenbank deponiert. Die Ermittlung der RMSD-Werte habe ich mit dem Programm ProFit durchgeführt. Alle Autoren haben zum Entwurf des Manuskripts beigetragen.

3.2 Einleitung

Bei der Leitstruktur-Optimierung ist die Proteinkristallographie ein unverzichtbares Hilfsmittel zur Analyse der Wirkstoffbindung. Die Kenntnis von Bindungsmotiven und nicht-kovalenten Wechselwirkungen sind für die Entwicklung von Folgeverbindungen unerlässlich. Zum Erhalt von Protein-Ligand-Komplexen werden üblicherweise zwei Protokolle angewandt: Kokristallisation und *Soaking* (deutsch: Tränken). Wegen ihrer Zeit- und Kosteneffizienz ist das *Soaking* die beliebtere Methode. Anhand von acht Bindern an der Scharnierregion (engl. *hinge region*, kurz *Hinge*) der Proteinkinase A zeigen wir, dass die Kokristallisation die geeignetere Methode ist. Insbesondere bei größeren Liganden und flexiblen Proteinen, wie Kinasen, erfasst die Kokristallisation zuverlässiger die korrekten Bindungsmotive und induzierten Proteinanpassungen. Die geometrischen Diskrepanzen zwischen *Soaking* und der Kokristallisation erscheinen für kleinere, fragmentartige Liganden geringer. Bei größeren flexiblen Liganden, die Konformationsänderungen des Proteins auslösen, kann das

Soaking irreführend sein und die Anzahl möglicher polarer Wechselwirkungen kann aufgrund inadäquater, stark beeinträchtigter Positionen der Seiten- und Hauptkettenatome der Protein-Aminosäure unterschätzt werden. Daher sollte nach Möglichkeit die Kokristallisation der Standard für die Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen sein.

Zweifellos ist die Röntgenkristallographie die leistungsfähigste Methode zur Aufklärung der Bindungsmotive von Liganden, die an Proteine gebunden sind. Selbst bei sehr schwachen Bindern, wie bei niedermolekularen Fragmenten mit einem Molekulargewicht von weniger als 200 g/mol, ist dies möglich.^[88,89] Damit dient diese Methode als unverzichtbare Informationsquelle bei der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung. In der Vergangenheit wurde die Kristallographie als zu langsam und umständlich bewertet, um routinemäßig Wirkstoffentwicklungs- und Optimierungsprojekte zu unterstützen. Verbesserungen an Synchrotron-Einrichtungen, unterstützt durch automatisierte Prozesse für die Proben- und Datenverarbeitung, ermöglichen mittlerweile die Datenerfassung von mehr als 200 Datensätzen pro Tag.^[90–92] Dieser große Sprung in der Datenerfassungstechnologie entlastet somit diesen Engpass und ermöglicht zeitnahe Strukturbestimmungen. Allerdings verlagert er die Herausforderung zurück auf die Probenvorbereitung. Mit der erreichbaren Datenerfassungsgeschwindigkeit wird die Handhabung vieler Kristalle mit mehreren Ligand-Kandidaten während der anfänglichen Leitstrukturfindung und der anschließenden Optimierung zunehmend machbar und erfreut sich zunehmender Popularität.

Im Prinzip können zwei Strategien verfolgt werden, um Kristalle für die Datensammlung geeigneter Protein-Ligand-Komplexstrukturen vorzubereiten. Die erste Technik der Kokristallisation beginnt damit, dass ein Ligandmolekül dem Protein in Lösung ausgesetzt wird und aus dieser Lösungsmischung der Protein-Ligand-Komplex kristallisiert wird. Da die Kristallisationen einige Tage bis zu mehreren Wochen dauern können, kann dieser Prozess recht aufwendig und mühsam sein. Auch wenn die Kristallisationsbedingungen im Voraus etabliert werden müssen und in der Regel unverändert als Ausgangsbedingungen für die Kristallisation der einzelnen Protein-Ligand-Komplexe angewendet werden, so ist der Erfolg der Kristallisation schwer abzuschätzen. Erfolg oder Misserfolg kann in der

Regel erst nach einer ausreichend langen Kristallisations-Versuchszeit beurteilt werden. Gegebenenfalls sind die Bedingungen für jeden Protein-Ligand-Komplex zu optimieren.

Aber auch das *Soaking* ist nicht unproblematisch. Obwohl die Diffusion von kleinen molekularen Sonden in Proteinkristalle sehr schnell sein sollte und vielleicht nur den Bruchteil einer Sekunde erfordert, wurden Fälle berichtet, in denen das *Soaking* Stunden oder sogar Tage benötigt, um einen Liganden in einer Bindetasche des Proteins vollständig zu besetzen. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass nicht nur die Affinität, sondern auch die Diffusionskinetik in die Kristalle für ein erfolgreiches Binden wichtig ist. Folglich ist über die Konzentration hinaus auch die *Soaking*-Zeit des exponierten Liganden ein wichtiger, anzupassender Faktor.^[93]

Da die Bindung an vorgefertigten Kristallen untersucht wird, bleibt die Frage, inwieweit sich das bereits kristallisierte Protein an die Bindung des zu tränkenden Liganden anpassen kann. Die aktuelle Studie konzentriert sich auf den Vergleich der beiden populären Protokolle, *Soaking* und Kokristallisation, um Kristalle von Protein-Ligand-Komplexen herzustellen. Für unsere Fallstudie wählten wir die in **Abbildung 1.5** gezeigte cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aus, welche ein typischer Vertreter der klinisch hoch relevanten Klasse von Proteinkinasen darstellt.^[74] Im aktuellen Kontext sind Kinasen besonders interessant, da sie bekanntermaßen hochflexible Proteine sind und induzierte Anpassungen durch die gebundenen Liganden ausgelöst werden können.^[94–96] Kinasen weisen die so genannte Glycin-reiche Schleife (Gly-loop, siehe **Abbildung 1.5**) auf, die benachbart zum aktiven Zentrum positioniert ist und mehrere Konformationen annehmen kann.^[97] Wir werden für die Ergebnisse aus *Soaking*-Experimenten zeigen, dass bei diesen nicht nur das Risiko besteht die Protein-Ligand-Wechselwirkungsmuster und abweichenden Proteinkonformationen, im Vergleich zur biologisch relevanten Geometrie unter Lösungsbedingungen, falsch darzustellen. Es könnte darüber hinaus auch dazu führen, dass die Ligand-Orientierungen im aktiven Zentrum beeinflusst werden. Offensichtlich nimmt das angewendete Kristallisationsprotokoll Einfluss auf die Konformationsänderungen, die das Protein bei der Ligandenbindung erfährt. Das Ausmaß der strukturellen Abweichungen zwischen *Soaking* und Kokristallisation scheint mit der Größe und Konformationsflexibilität des untersuchten

Liganden zuzunehmen. Dies spricht eindeutig für das schnelle und unkomplizierte *Soaking*-Protokoll zur Untersuchung kleiner und starrer Binder wie Fragmente, wohingegen für größere Liganden die Anwendung von Kokristallisationsprotokollen ratsamer zu sein scheint. Insbesondere trifft dies auf Liganden in der Phase der Leitstruktur-Optimierung zu, in der Überlegungen zum molekularen *Design* in hohem Maße von genauen Strukturdaten abhängen.

3.3 Ergebnisse

Um die oben benannte Diskrepanz zu untersuchen, analysierten wir eine Reihe von Liganden, die von dem zugelassenen Medikament Fasudil (**20**, **Abbildung 3.1**) im Komplex mit der PKA abgeleitet sind. Die betrachteten Liganden unterscheiden sich sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Fähigkeit, alternative Konformationen von Proteinhaupt- und seitenketten zu induzieren. Für den Vergleich wurden sowohl Kokristalle als auch Kristalle nach dem *Soaking*-Verfahren präpariert und röntgenkristallographisch untersucht.

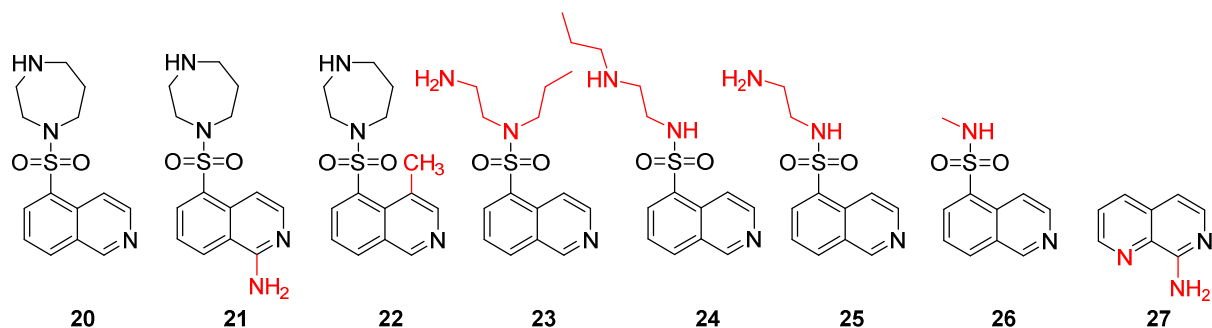


Abbildung 3.1: Überblick über die in dieser Studie verwendeten Verbindungen. Ligand **20** ist Fasudil und **21**, das um eine Aminogruppe erweiterte Derivat. **22**: eine methylierte Form von Fasudil. **23**: Offenkettiges *N*-(2-Aminoethyl)-*N*-propylisochinolin-5-sulfonamid. **24**: Langkettiges *N*-[2-(Propylamino)ethyl]-isochinolin-5-sulfonamid. **25**: kurzkettiges *N*-(2-Aminoethyl)-isochinolin-5-sulfonamid. **26**: fragmentartiges, methyliertes *N*-Methylisochinolin-5-sulfonamid. **27**: 1,7-Naphthyridin-8-amin.

Fasudil und sieben strukturell verwandte Liganden wurden in dieser vergleichenden Studie verwendet. Für jeden Ligandkomplex wurde die Struktur röntgenkristallographisch untersucht, wobei sowohl eine

durch *Soaking* erhaltene als auch eine kokristallisierte Probe verwendet wurde und zu insgesamt 16 PKA-Komplex-Strukturen führte. Die einzelnen Strukturen variieren in der Auflösung zwischen 1.37-2.01 Å ohne signifikanten Auflösungsvorteil für Strukturen, die entweder durch das *Soaking*- (Mittelwert: 1.58 Å) oder Kokristallisationsprotokoll (Mittelwert: 1.59 Å) erhalten wurden. Die Überlagerungen der jeweiligen Strukturpaare, die jedes Mal den gleichen gebundenen Liganden zeigen, sind in **Abbildung 3.2-3.9** dargestellt.

Abbildung 3.2 zeigt Fasudil (**20**) im Komplex mit der PKA. Die Position der Glycin-reichen Schleife ist in der kokristallisierten Struktur weiter geöffnet. Dies betrifft insbesondere die Reste Gly50 bis Ser53, bei denen die Peptidrückgratatom um etwa 2 Å verschoben sind. Für den Homopiperazin-Anteil der Liganden ergeben sich die Abweichungen hauptsächlich aus den unterschiedlichen Ringkonformationen, die in den beiden Fällen eingenommen werden. Der RMSD-Wert (engl. *root-mean-square deviation*) der Liganden zwischen beiden Strukturen beträgt 0.97 Å. Ein niedrigerer Wert von 0.49 Å wird für die C α -Atome der Scharnierregion gefunden, an der die Liganden gebunden sind. Die beiden Homopiperazin-Konformere führen zu abweichenden H-Brückenbindungsmustern, die zu den benachbarten Proteinresten ausgebildet werden. Tatsächlich zeigt der Ligand in der kokristallisierten Struktur mehr polare Wechselwirkungen und schließt Asp184 und Glu170 ein, während in der durch *Soaking* erhaltenen Struktur lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asn171 ausgebildet wird.

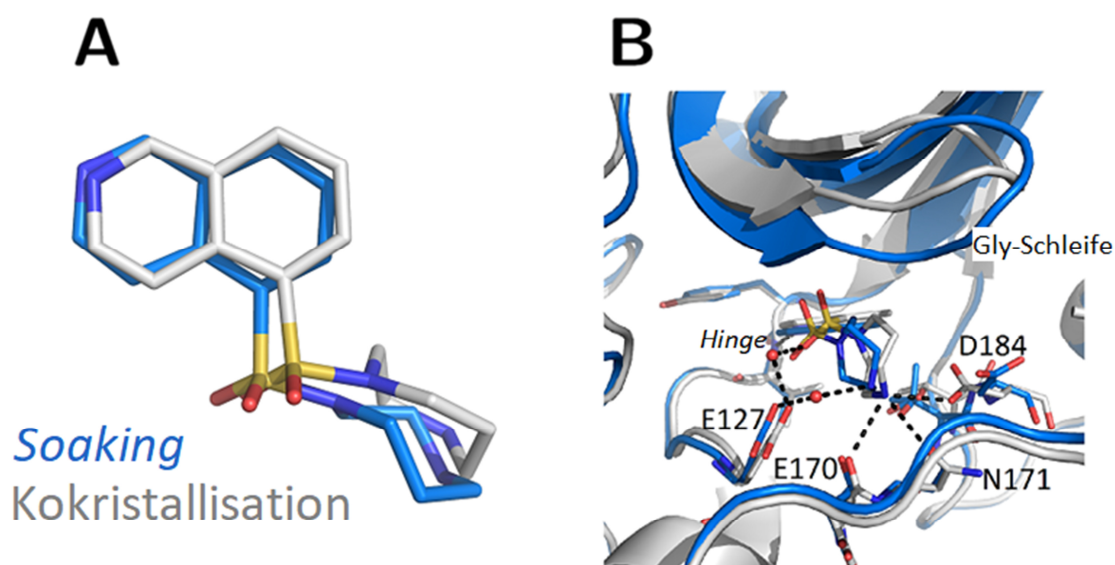


Abbildung 3.2: Kristallstrukturen von Fasudil (20) in Komplex mit der PKA von einem gesoakten (blau, PDB-Code: 6YNA) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, PDB-Code: 5LCP). (A) Die Überlagerung deutet auf eine leichte Rotation des Liganden zwischen beiden Strukturen hin (RMSD-Ligand: 0.97 Å, RMSD der Ca Atome der Scharnierregion: 0.49 Å). (B) Überlagerung der aktiven Tasche. Die Gly-reiche Schleife ist mit einer weiter geöffneten Geometrie in der Kokristallstruktur positioniert. Diese Struktur zeigt mehr Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Liganden und der PKA als im gesoakten Fall. In dieser und den folgenden Abbildungen sind die Heteroatome entsprechend des Typs kodiert (C: unterschiedlich für die einzelnen Komplexe, N: blau, O: rot, S: gelb). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Die Kristallstruktur von Aminofasudil (21) ist in **Abbildung 3.3** dargestellt. Ähnlich wie bei 20 stimmt das Aminoanalogon gut mit dem Isochinolin-Anteil überein, zeigt aber eine leicht abweichende Orientierung des Homopiperazinrings. In der kokristallisierten Struktur finden sich zwei alternative Konformationen mit identischen Besetzungen des siebengliedrigen Rings. Von diesen beiden weist eine die gleiche Konformation wie in der *gesoakten* Struktur auf. Die Zweite nimmt in der *gesoakten* und in der kokristallisierten Struktur eine andere Konformation an (RMSD: 0.62; 0.69 Å). Die räumliche Verschiebung erlaubt jedoch nur in der *gesoakten* Struktur die Ausbildung von zwei wasservermittelten Wasserstoffbrückenbindungen zu Asn171 und Asp184.

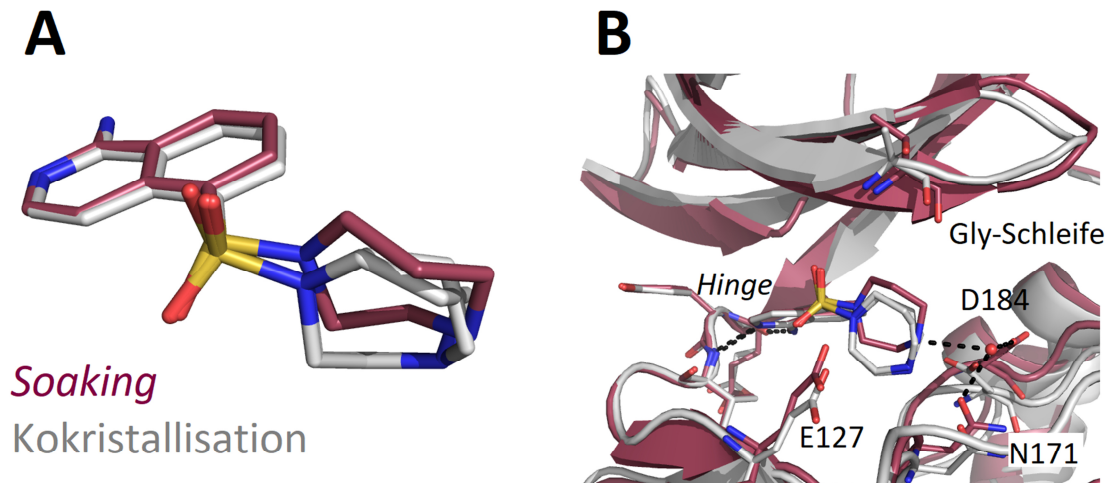


Abbildung 3.3: Kristallstrukturen von Aminofasudil (**21**) in Komplex mit der PKA von einem gesoakten (violett, PDB-Code: 6YNT) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, PDB-Code: 6Y8C). Der Homopiperazinring nimmt in der kokristallisierten Struktur zwei Konformere an. (A) Die Strukturüberlagerung deutet auf eine leichte Verschiebung des Liganden zwischen beiden Strukturen hin (RMSD-Ligand: 0.62; 0.69 Å, RMSD der C α Atome der Scharnierregion: 0.49 Å). (B) Überlagerung der aktiven Zentren. Die Orientierung der Gly-Schleife ist zwischen den beiden Komplexen leicht unterschiedlich. Der Ligand interagiert in beiden Fällen mit der Scharnierregion, aber ein Wassermolekül vermittelt Wechselwirkungen mit Asp184 und Asn171 nur in der Struktur, die nach dem Soaking-Ansatz erhalten wurde.

Abbildung 3.4 zeigt die Bindungsmotive für das methylierte Fasudil (**22**). Hier weisen die Positionen des Liganden eine größere Übereinstimmung auf als beim Liganden **20** (RMSD: 0.67 Å). Die Position der Gly-reichen Schleife ist in der Elektronendichte für die *gesoakte* Struktur nicht vollständig definiert. Nichtsdestotrotz sind die Aminosäurereste der Schleife für den durch die Elektronendichte definierten Teil überlagert. Der RMSD-Wert der C α Atome des Proteins an der Scharnierregion beträgt 0.29 Å. Im Gegensatz zu **20**, aber ähnlich wie bei **21**, weisen die räumlichen Positionen und eingenommenen Konformationen der Homopiperazin-Einheit ähnliche Orientierungen auf.

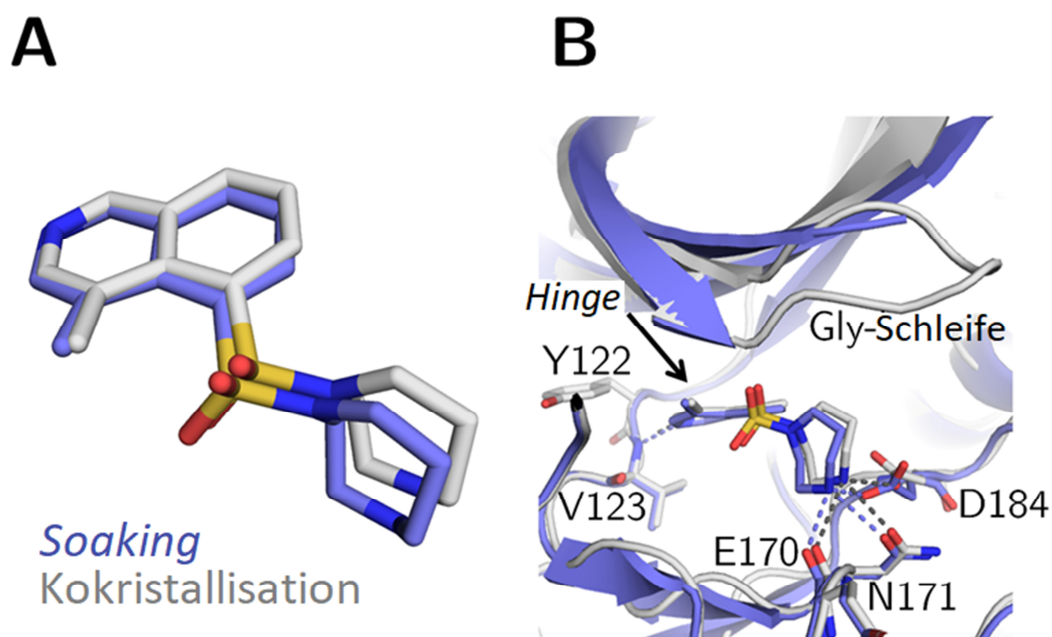


Abbildung 3.4: Kristallstrukturen von methyliertem Fasudil 22 in Komplex mit der PKA von einem gesoakten (blau, PDB-Code: 6YQK) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, PDB-Code: 5M6Y). (A) Die strukturelle Überlagerung deutet auf eine leichte Rotation des Liganden in beiden Fällen hin (RMSD-Ligand: 0.67 Å, RMSD der C α Atome der Scharnierregion: 0.29 Å). (B) Überlagerung der aktiven Tasche. Die Position der Gly-reichen Schleife ist für die gesoakte Kristallstruktur nicht sichtbar. Das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen ist in beiden Komplex-Strukturen ähnlich.

Eine teilweise ungeordnete Gly-reiche Schleife wird auch in der *gesoakten* Struktur des offenkettigen N-(2-Aminoethyl)-N-propylisochinolin-5-sulfonamids (**23**) beobachtet (**Abbildung 3.5**). Darüber hinaus nimmt der Aminoethylsubstituent in beiden Komplexen eine abweichende Position ein. Infolgedessen findet sich in den Kristallstrukturen, die sich aus den beiden Kristallisationsprotokollen ergeben, ein unterschiedliches Interaktionsmuster des Aminoethyl-Stickstoffs des Liganden mit dem Protein.

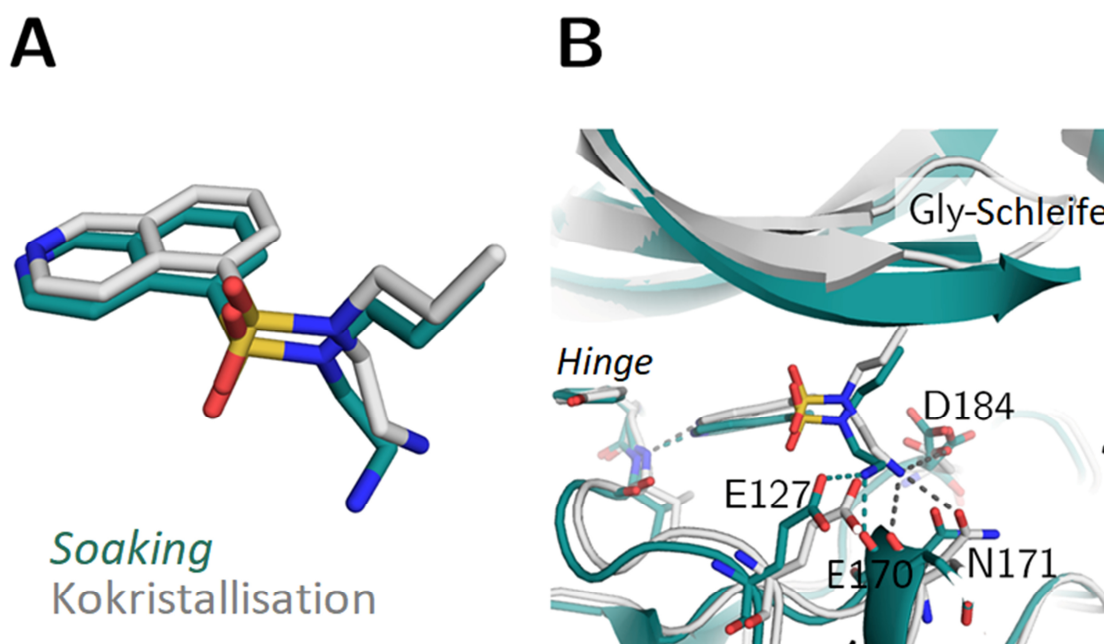


Abbildung 3.5: Kristallstrukturen des offenkettigen Fasudil-Derivats 23 in Komplex mit der PKA von einem gesoakten (blaugrün, PDB-Code: 6YQJ) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, PDB-Code: 5LCR). (A) Die Strukturüberlagerung deutet auf eine leichte Verschiebung des gesamten Liganden sowie auf eine veränderte Position der Aminoethylgruppe in den beiden Strukturen hin (RMSD-Ligand: 0.93 Å, RMSD der C α Atome der Scharnierregion: 0.42 Å). (B) Überlagerung der aktiven Tasche. Die Position der Gly-reichen Schleife ist in der gesoakten Kristallstruktur nicht sichtbar. Das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen unterscheidet sich zwischen den durch die beiden Protokolle erhaltenen Strukturen. In der kokristallisierten Struktur werden Wasserstoffbrückenbindungen zu der Scharnierregion, den Seitenketten von Asp184 und Asn171 und das Rückgrat von Glu170 ausgebildet. In der gesoakten Struktur sind nur die Scharnierregion und das Rückgrat von Glu170 an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Zusätzlich wird in der gesoakten Struktur eine zusätzliche H-Brücke zu der Seitenkette von Glu127 gebildet.

Die auffälligsten Unterschiede zwischen gesoakter und kokristallisierter Struktur wurden für das langkettige N-[2-(Propylamino)ethyl]-isochinolin-5-sulfonamid (**24**) und das kurzkettige N-(2-Aminoethyl)-isochinolin-5-sulfonamid (**25**) beobachtet, obwohl jeweils beide Liganden einen gemeinsamen Bindungsmodus bezüglich der Scharnierregion aufweisen. Im kokristallisierten Komplex mit **24** (Abbildung 3.6) bewirkt eine starke räumliche Verschiebung die Abwärtsbewegung der Gly-reichen Schleife. Diese Verschiebung wird durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Liganden und Thr51 des Proteins ausgelöst. Diese ist in der gesoakten Kristallstruktur

nicht vorhanden. Das wiederum führt zu einer veränderten Position des Liganden, in der das Sulfonamid als ein alternatives Rotamer vorliegt. Der Winkel zwischen dem Sulfonamid-Stickstoff und der Ebene durch die Atome des Isochinolin-Rings ist für eine Beschreibung der Rotation geeignet. Für die *gesoakte* Struktur beträgt dieser Winkel 94° , während er bei ähnlicher Orientierung für den Liganden in der kokristallisierten Struktur nur 26° beträgt.

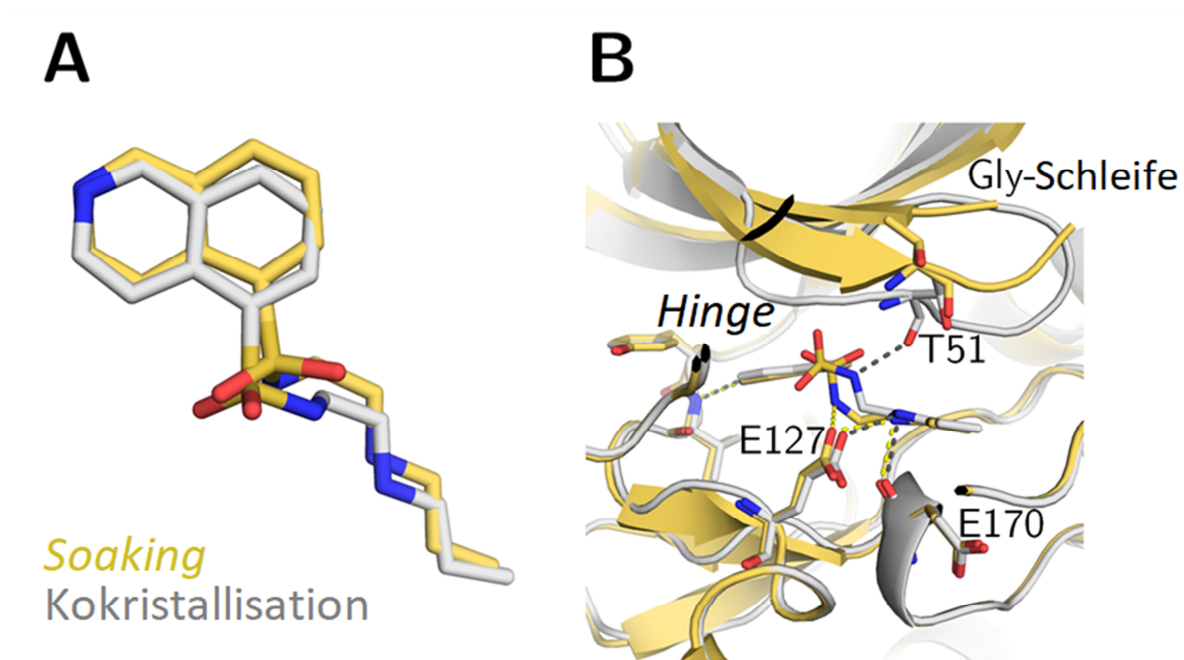


Abbildung 3.6: Kristallstrukturen eines langkettigen Fasudil-Derivats **24** in Komplex mit der PKA von einem *gesoakten* (gelb, PDB-Code: 6YQI) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, PDB-Code: 5LCQ). (A) Die Strukturüberlagerung zeigt das Binden des Sulfonamidanteils in alternativen rotamerischen Konformationen und mit einer unterschiedlichen Platzierung des angehängten Substituenten in den beiden Strukturen an (RMSD-Ligand: 0.89 \AA , RMSD der $\text{C}\alpha$ Atome der Scharnierregion: 0.37 \AA). (B) Überlagerung der aktiven Tasche. Die Position der Gly-reichen Schleife ist für die *gesoakte* Struktur nicht vollständig definiert. Auffällig ist, dass sich die Positionen der, in der *gesoakten* Struktur sichtbaren Reste in ihrer Position stark von der Position der kokristallisierten Struktur unterscheiden. Nur in der kokristallisierten Struktur wird die Gly-reiche Schleife in das aktive Zentrum hinuntergezogen, und eine Wasserstoffbrückenbindung zu Thr51 wird nur in diesem Komplex gebildet, während die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von Glu127 und dem Sulfonamid-Stickstoff von **24** nur in der nach dem Soaking-Verfahren erhaltenen Struktur vorhanden ist.

Die gleiche Beobachtung wird für **25** gemacht (**Abbildung 3.7**). Bei dieser Struktur sind die Unterschiede zwischen der *gesoakten* und der kokristallisierten Struktur noch ausgeprägter. Das gedrehte Sulfonamid (der Winkel zwischen der Isochinolinebene und den Sulfonamid-Stickstoffbindungen beträgt 25° für den kokristallisierten und 103° für den getränkten Kristall, ähnlich wie bei **24**) geht mit einer Bewegung der Aminoethyleinheit einher, die in beiden Fällen in entgegengesetzte Richtungen weist. Nichtsdestotrotz gibt es in beiden Strukturen, die aus dem *Soaking* und der Kokristallisation resultieren, drei Wasserstoffbrückenbindungen, welche zum Protein ausgebildet werden.

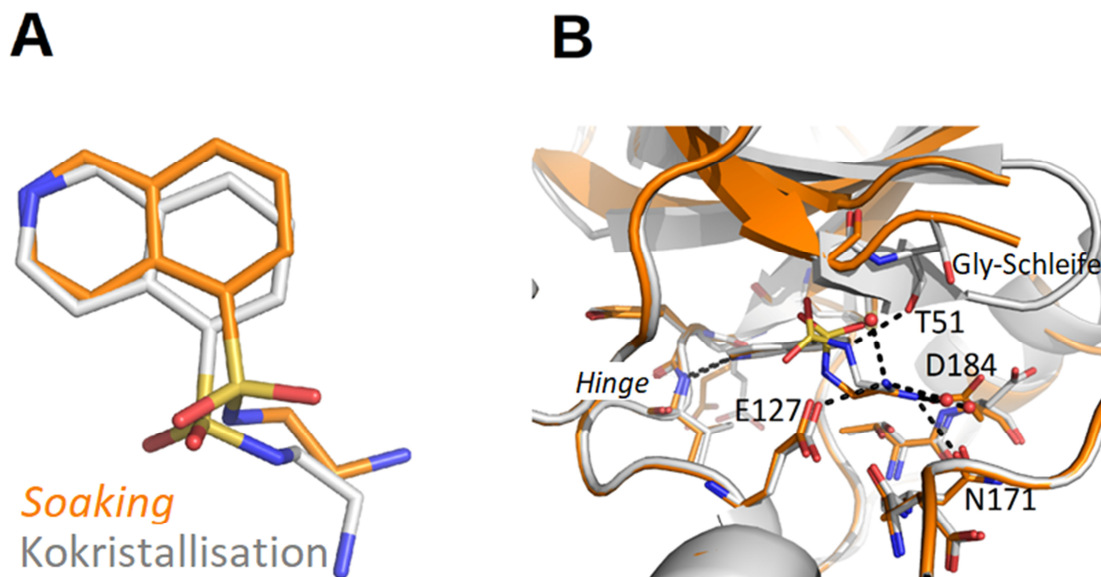


Abbildung 3.7: Kristallstrukturen des kurzketigen Fasudil-Derivats **25** im Komplex mit der PKA von einem *gesoakten* (orange, PDB-Code: 6YNB) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, PDB-Code: 5MOB). (A) Die Strukturüberlagerung deutet auf eine starke Rotation des Sulfonamidanteils und des angehängten Substituenten des Liganden zwischen den beiden Strukturen hin (RMSD-Ligand: 1.24 \AA , RMSD der $\text{C}\alpha$ Atome der Scharnierregion: 0.31 \AA). (B) Überlagerung der aktiven Tasche. Die Position der Gly-reichen Schleife ist für die Kristallstruktur des *gesoakten* Kristalls nicht vollständig definiert. Auffällig ist, dass sich die Positionen der, in der *gesoakten* Struktur sichtbaren Reste (Thr51 und Gly52) in ihrer Rückgratposition um $2.2\text{--}5.0 \text{ \AA}$ von der kokristallisierten Struktur unterscheiden. Lediglich in letzterer Struktur wird die Gly-reiche Schleife nach unten zum aktiven Zentrum hingezogen. In beiden Komplexen werden abweichende Wasserstoffbrückenbindungsmuster zu unterschiedlichen Aminosäuren gebildet. Im *gesoakten* Fall sind sie zu Val123, Asn171 und Asp184 etabliert, im kokristallisierten Beispiel zu Val123, Thr51 und Glu127.

Der Bindungsmodus des fragmentartigen Liganden N-Methylisochinolin-5-sulfonamid (**26**, **Abbildung 3.8**) führt zu nahezu identischen Bindungsmoden für Kristalle, die mit den beiden Kristallisationsprotokollen erhalten wurden (RMSD-Ligand: 0.17 Å, RMSD der C α Atome der *Hinge*-Region: 0.20 Å). In einem weiteren Beispiel haben wir das Fragment 1,7-Naphthyridin-8-amin (**27**) mit der PKA nach beiden Protokollen komplexiert. Wie im Komplex mit **26** wird eine perfekte Übereinstimmung beider Strukturen gefunden (**Abbildung 3.9**).

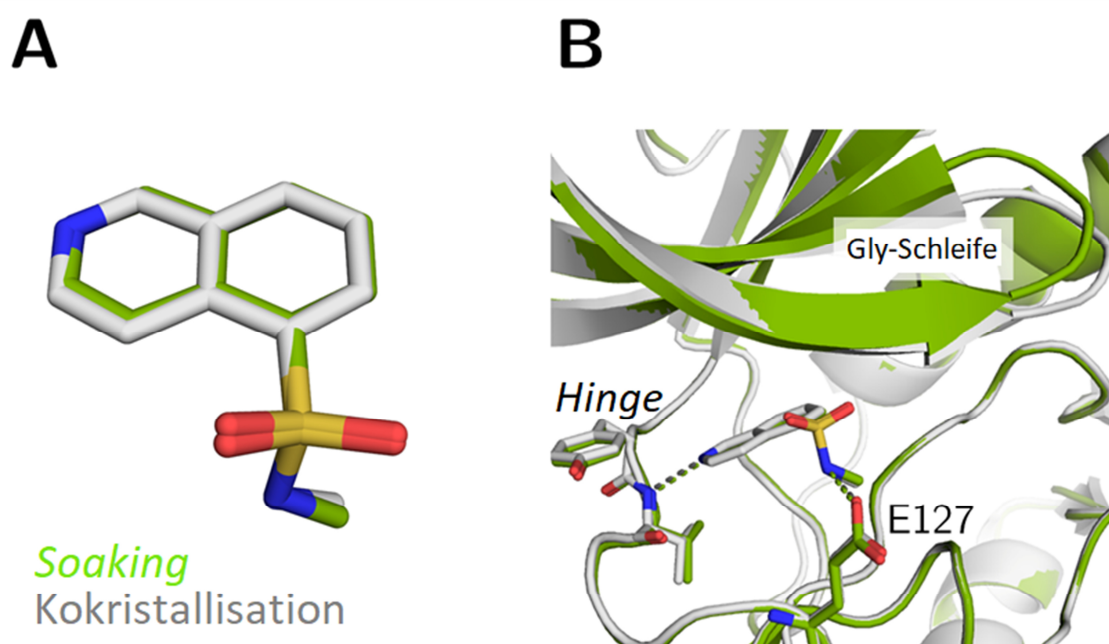


Abbildung 3.8: Kristallstrukturen des Fasudil-Fragments 26 in Komplex mit PKA von einem gesoakten (grün, *pdb*-Code: 6YNC) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, *pdb*-Code: 5MOL). (A) Die Ligandenüberlagerung zeigt eine unveränderte gebundene Konformation und Bindungsposition in beiden Strukturen (RMSD-Ligand: 0.17 Å, RMSD der C α Atome der Scharnierregion: 0.20 Å). (B) Überlagerung der aktiven Stelle. Die Position der Gly-Schleife unterscheidet sich nur geringfügig. Die Wasserstoffbrückenbindungsmuster zwischen Ligand und PKA sind in beiden Strukturen identisch.

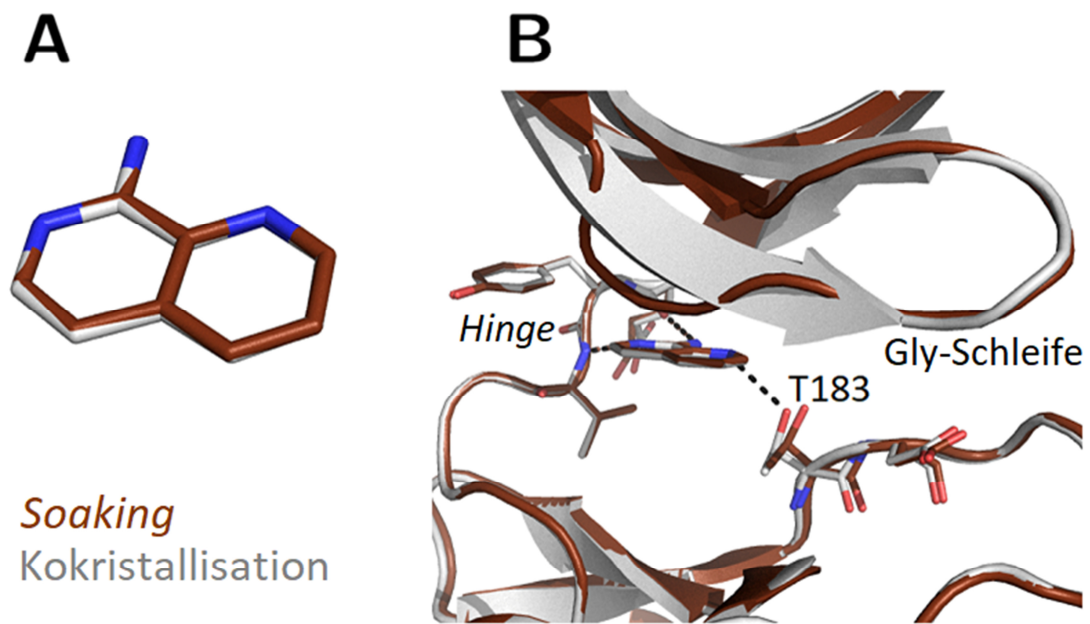


Abbildung 3.9: Kristallstrukturen des Fragments 1,7-Naphthyridin-8-amin (27) in Komplex mit der PKA von einem gesoakten (braun, PDB-Code: 6YNR) und einem durch Kokristallisation erhaltenen Kristall (grau, PDB-Code: 6Y2O). (A) Die Strukturüberlagerung zeigt eine perfekte Überlagerung in beiden Strukturen (RMSD-Ligand: 0.13 Å, RMSD der C α Atome der Scharnierregion: 0.21 Å). (B) Überlagerung der aktiven Zentren. Die Position der Gly-reichen Schleife ist in beiden Strukturen identisch, und zwischen Ligand und Protein ist das gleiche Wasserstoffbrückenbindungsmuster etabliert. Der einzige Unterschied ist eine leichte Verschiebung von Thr183 im kokristallisierten Fall. Diese ist für die Wechselwirkung mit dem endocyclischen Stickstoff innerhalb des Liganden des kokristallisierten Beispiels verantwortlich.

3.4 Diskussion

Im Prozess der Wirkstoffentwicklung und der Leitstrukturoptimierung ist die Proteinkristallographie ein unverzichtbares Hilfsmittel, um die Bindung eines Wirkstoffs an ein Zielprotein zu analysieren.^[98] Sowohl der Bindungsmodus als auch die tatsächlich beobachteten, nicht kovalenten Wechselwirkungen wie Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen werden charakterisiert und können in Bezug auf Abstände und Winkelbeziehungen ausgewertet werden. Solche Informationen sind unerlässlich, um die Entwicklung nachfolgender Wirkstoffkandidaten für die Synthese zu steuern. Es gibt mit dem *Soaking* und der Kokristallisation zwei

häufig angewandte Protokolle zur Erzeugung von Protein-Ligand-Komplexen, welche anschließend für die kristallographische Analyse verwendet werden können.^[99]

Bei der Kokristallisation werden Protein und Ligand vor den Kristallisationsversuchen in Lösung gemischt, und der zusammengesetzte Protein-Ligand-Komplex wird aus dem Lösungsgleichgewicht in die kristalline Phase überführt.^[99,100] Aufgrund des Vorhandenseins des Liganden und der, in den meisten Fällen benötigten Zugabe unterschiedlicher Mengen an Lösungsmitteln, wie DMSO oder anderen Additiven, können sich die Bedingungen für eine Reihe von Kokristallisationsversuchen mit verschiedenen Liganden erheblich unterscheiden. Manchmal sind Anpassungen hin zu völlig neuen Bedingungen erforderlich. Daher kann die Entwicklung erfolgreicher Kokristallisationsprotokolle recht zeitaufwändig und ressourcenintensiv sein.^[101]

Insbesondere in der Industrie ist die wesentlich schnellere *Soaking*-Methode aufgrund der auferlegten Zeitbeschränkungen beliebt. Hier wird das Protein in seinem unkomplexierten Zustand ohne gebundenen Liganden kristallisiert. Die vorgefertigten, Ligand-freien Kristalle werden dann in einem Tropfen exponiert, der eine hohe Konzentration des Kandidatenliganden enthält, für den die Bindungspose geklärt werden soll. Der Ligand kann üblicherweise in kurzer Zeit in den Kristall diffundieren und an das Protein binden. Voraussetzung für den Erfolg dieses Verfahrens ist das Vorhandensein ausreichend großer, mit Wasser gefüllter Kanäle, die den Kristall durchziehen und auf diese Weise an die relevante Proteinbindestelle gelangen. Falls das *Soaking* erfolglos bleibt, sollte ein erster Schritt darin bestehen, die Durchlässigkeit der Kristallpackungskanäle der zum *Soaking* verwendeten Kristallform zu validieren. Dennoch ist das *Soaking* in jedem Fall die schnellere Methode. Sie erfordert wesentlich weniger Material und baut auf einem gut etablierten Kristallisationsprotokoll auf.^[99] Da das unkomplexierte Protein gut kristallisiert, können Hunderte von unterschiedlich *gesoakten* Kristallen von einer einzigen Kristallisationsplatte aus erhalten werden, was die Perspektive eröffnet, die Kristallographie für *Screening*-Zwecke einzusetzen. Bei der Kokristallisation hingegen können leicht mehrere Kristallisationsplatten für einen Ligand erforderlich sein, um optimale Bedingungen zu finden und zu einem hohen Bedarf an Protein- und Ligandenmaterial führt. Da ein

Screening nach neuartigen Bedingungen meistens erforderlich ist, kann nicht erwartet werden, dass die Kristallisation die gleiche Kristallpackung aufweist. Der Erhalt einer anderen Packung und somit die häufige Überführung in eine andere Raumgruppe, ist wahrscheinlich eher die Regel als die Ausnahme (s. Beispiel unten).

Über Beispiele von Unterschieden zwischen Kristallstrukturen, die aus *gesoakten* und kokristallisierten Kristallen erhalten wurden, ist bereits berichtet worden.^[102–107] Die Zahl der systematischen und gut dokumentierten Beispiele in der Literatur ist vor dem Hintergrund ihrer Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung jedoch immer noch überraschend gering. Lediglich über die humane Aldose-Reduktase,^[100] die Glutathion-S-Transferase des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* (PfGST), die Lymphozyten-spezifische Kinase (Lyck) und die tRNA-Guanin-Transglykosylase, ein Target zur Bekämpfung von Shigella-Infektionen, wurde ausführlich berichtet.^[105–107]

Es ist anzumerken, dass in unseren Kristallisationsexperimenten das PKI-Peptid von zwei verschiedenen Längen (und zwei verschiedenen Lieferanten) zur Unterstützung des Kristallisationsprozesses verwendet wurde. Der zentrale Teil von Rest 13 bis 22 ist in allen Strukturen gut definiert und zeigt, abgesehen von einem Peptidflip zwischen Position 13 und 14 in einigen der Komplexe, nur geringfügige strukturelle Abweichungen. Je nach dem untersuchten Komplex variiert die Anzahl der in der Elektronendichte sichtbaren Reste am C- und N-Terminus des PKI-Peptids. Wir glauben, dass der Einfluss des PKI-Peptids keine Auswirkung auf die systematischen Unterschiede zwischen *Soaking* und Kokristallisation hat, die wir bei Liganden unterschiedlicher Flexibilität und Molekulargewicht beobachten. Diese Ergebnisse stimmen mit einer anderen kristallographischen Studie überein, in welcher wir das PKI-Peptid signifikant modifizierten und nur geringe Abweichungen in der Geometrie der PKA beobachten konnten.^[108]

In dem hier untersuchten PKA-Fall bleibt die Vergleichbarkeit von *gesoakten* und kokristallisierten Komplexen hinsichtlich der erhaltenen Bindungsmodi und der zwischen Protein und Liganden etablierten Interaktionsmuster insgesamt begrenzt. Wenn in einem Wirkstoffentwicklungsprojekt die

detaillierte Erweiterung zu Folgesubstanzen entweder auf den *gesoakten* oder auf den kokristallisierten Strukturen basieren würde, könnten verschiedene Optimierungsstrategien vorgeschlagen werden. Dies gilt insbesondere für die Liganden **23**, **24** und **25**. Es muss berücksichtigt werden, dass der vorliegende Fall als ideal betrachtet werden muss, da die Kristallpackung und Raumgruppensymmetrie für diese drei Liganden zwischen dem *Soaking*-Verfahren und der Kokristallisation erhalten bleibt. Wie die meisten Kinasen ist die PKA, insbesondere in der Nähe des aktiven Zentrums, ein flexibles Protein. Da wir eine hohe Ähnlichkeit der hier vorgestellten kokristallisierten Strukturen und 2D-NMR-Experimente beobachtet haben, können wir davon ausgehen, dass unsere kokristallisierten Strukturen die bessere Annäherung sind, welche die relevante Protein-Ligand-Geometrie auch in Lösung repräsentiert.^[109,110] Es ist bekannt, dass Ligandbindungen in Lösung an die PKA zu Konformationsänderungen der Gly-reichen Schleife führen können. Diese Anpassungen würden bei alleiniger Betrachtung der *gesoakten* Kristallstrukturen übersehen werden. Die Kristallisation nach der Kokristallisationsmethode erstreckt sich über eine lange Zeitspanne und höchstwahrscheinlich sind Gleichgewichtsbedingungen gegeben, die lediglich mit dieser Methode erfasst und konserviert werden können. Bei *Soaking*-Experimenten ist dies anders, da sich das unkomplexierte Protein im vorgefertigten Kristall anordnet. Daher erlaubt die räumlich eher eingeschränkte Umgebung in der Kristallpackung, mit dicht gepackten Proteinmolekülen, nur geringe Bewegungen bei der Diffusion des Liganden in den Kristall. Erforderliche Anpassungen sind räumlich begrenzt und daher ist eine energetisch günstige Anpassung erforderlich, um eine gesamte Schleife bei der Bindung in eine veränderte Position zu bringen. Dies kann nicht im erforderlichen Umfang erfolgen.

Das folgende Beispiel unterstreicht diese Einschränkung. In unserer Arbeitsgruppe wurden kürzlich die Kristallstrukturen einer kongeneren Reihe von Trypsinliganden bestimmt. Alle Experimente wurden durch Kokristallisation durchgeführt und es ergab sich ein schlüssiges und in sich konsistentes Bild der Bindungsmotive. Da die Kristallisation von Trypsin knifflig sein kann, wurde darüber hinaus die Methode des *Soakings* an Trypsin-Kristallen angewendet. Für Ligand **28 (Abbildung 3.10)** wurde, zusätzlich zu der zuvor bestimmten kokristallisierten Struktur,^[111] eine komplexierte Struktur durch *Soaking* erhalten (Details zur *gesoakten* Struktur, siehe Veröffentlichung^[87]).

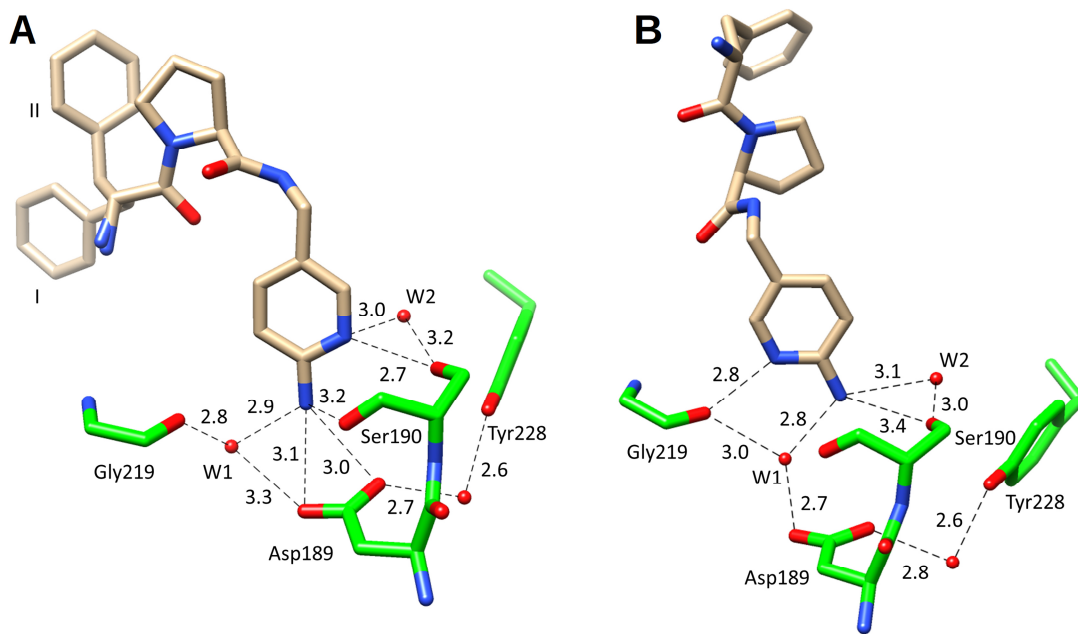


Abbildung 3.10: Kristallstrukturen von **28** in der S1-Tasche von Trypsin (Ligand in hellbraun, Proteinreste in grün, Heteroatome farbcodiert). Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. (A) Kokristallisierte Struktur in der orthorhombischen Raumgruppe ($P2_12_12_1$, PDB-Code: 6T5W). Die Aminogruppe stellt eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asp189 her und der Pyridinstickstoff interagiert mit Ser190O γ . Die terminale P3-Gruppe nimmt zwei alternative Konformationen an (Besetzung ist 51% für I und 49% für II). (B) Die gesoakte Struktur weist eine trigonale Raumgruppe auf ($P3_12_1$, PDB-Code: 6QL0). Der Aminopyridylrest nimmt eine andere Orientierung ein und stellt abweichende Wechselwirkungen mit dem Protein her. Die Wechselwirkung zu Asp189 wird durch ein Wassermolekül vermittelt und die Aminogruppe bildet eine H-Brücke zu Ser190O γ .

Es handelt sich demnach um ein weiteres Beispiel, bei dem die Bindungspose des Liganden in der Kristallstruktur, die sich nach dem *Soaking* ergibt, nicht mit der aus der Kokristallisation übereinstimmt. Wenn die Bindungspose der P1-Gruppe des Liganden für die nachfolgende Optimierung verwendet würde, so könnte dies zu sehr unterschiedlichen Konsequenzen führen. Da eine ganze Reihe von kongeneren Liganden mit Trypsin untersucht wurde, ist die abweichende Geometrie, die in dieser *gesoakten* Struktur gefunden wurde, eindeutig eine Ausnahme. Es wurde ebenfalls die gleiche Reihe von Liganden gegen die verwandte Serinprotease Thrombin untersucht und es konnte beobachtet werden, dass die Bindungsmotive der mit Trypsin gefundenen kokristallisierten Strukturen entsprachen. Interessanterweise wurden alle Thrombinkomplexe durch *Soaking* erhalten.

Bemerkenswert ist, dass ihre Bindungsmotive mit denen der kokristallisierten Trypsinstrukturen übereinstimmen.

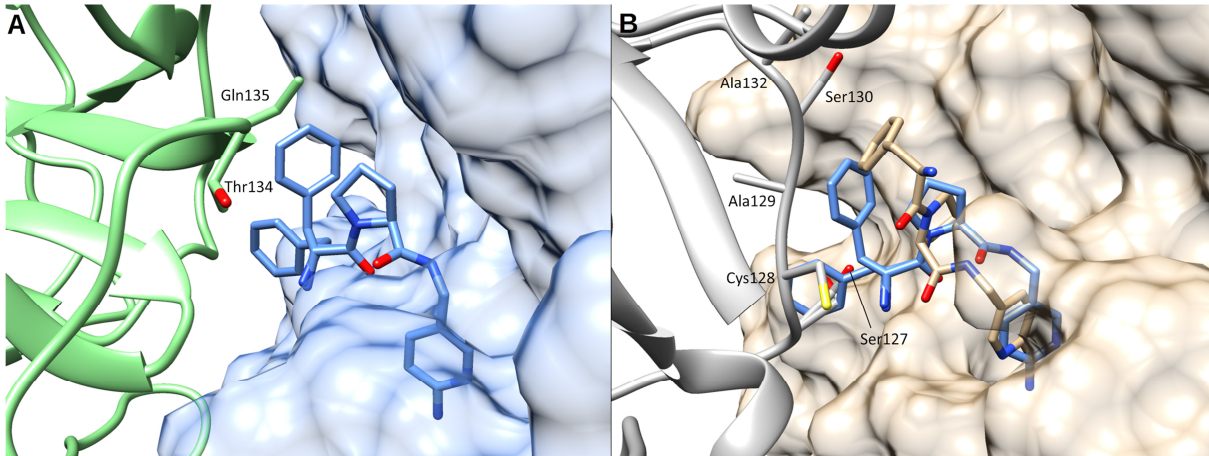


Abbildung 3.11: Lokale Packung von Trypsinmolekülen um 28 im orthorhombisch kokristallisierten (A) und trigonalen (B) Komplex aus dem Soaking. (A) Ein Trypsinmolekül (hellblaue Oberfläche) mit gebundenem **28** ist zusammen mit einem benachbarten Trypsinmolekül (grün) in der Einheitszelle dargestellt. Der Ligand findet ausreichend Platz, um sogar die beobachtete, doppelte Konformation des P3-Anteils anzunehmen. (B) Trypsin (beige Oberfläche) mit gebundenem **28** (beige), das benachbarte Trypsinmolekül in der Packung ist grau dargestellt. Der für **28** zur Verfügung stehende Platz ist begrenzt, der Ligand findet jedoch eine Bindungsposition im Soaking-Versuch. Um den Unterschied im verfügbaren Platz anzuzeigen, wurde eine Kopie von **28** in der Geometrie, die in der kokristallisierten Struktur gefunden wurde, überlagert (blau).

Daher ist eine detaillierte Betrachtung von Fall zu Fall erforderlich. Um die Unterschiede im aktuellen Trypsin-Fall nachzuvollziehen, wurde die lokale Packung der Trypsinmoleküle im *gesoakten* und kokristallisierten Komplex untersucht (**Abbildung 3.11**).

Wie aus der Packungsanalyse ersichtlich wird, besitzt die trigonale Packung der *Apo*-Kristalle nur einen begrenzten Raum zur Unterbringung des Liganden. Dieser Raum reicht jedoch nicht aus, um die über die gesamte Serie konsistent gefundene Bindungspose einzunehmen. Allerdings ist die eingenommene Pose nicht ganz unsinnig. Wäre dieser *gesoakte* Komplex der Einzige der Serie, welcher bestimmt worden wäre, dann würde diese Tatsache wahrscheinlich unentdeckt bleiben.

Wie das Trypsin-Beispiel sehr deutlich zeigt, besteht bei *gesoakten* Strukturen das Risiko, irreführende Bindungsmotive zu erhalten. Andererseits haben wir für das letztgenannte Beispiel gesehen, dass das *Soaking* bei der verwandten Protease Thrombin durchaus relevante Geometrien erzeugt. Wie ist dies bei dem aktuellen PKA-Fall? Für die Liganden **20**, **21** und **22** nimmt der siebengliedrige Ring überraschenderweise abweichende Konformationen an. In einem Fall (**20**) weichen die beobachteten Ringkonformationen voneinander ab, in einem zweiten Beispiel (**22**) sind sie sehr ähnlich. Die Konformationsflexibilität dieses Rings mit energetisch ähnlichen Minima zeigt sich in dem kokristallisierten Komplex von **21**, bei welchem die Einzelstruktur bereits zwei Konformere aufweist. Um dieses rätselhafte Bild zu vervollständigen, zeigt die *gesoakte* Struktur mit **21** nur ein Konformer, das mit einem Konformer des kokristallisierten Komplexes übereinstimmt und vom Zweiten abweicht. Die Liganden **23**, **24** und **25** zeigen, dass flexible Proteinbereiche in einer *gesoakten* Struktur ungeordnet bleiben können und dementsprechend in der Elektronendichte nicht definiert sind. Die Liganden **24** und **25** zeigen, dass eine geometrische Anpassung des Proteins während der Ligandbindung im *Soaking*-Prozess stark eingeschränkt ist. In diesem Fall beeinflusst das *Soaking* nicht nur die Anzahl der beobachteten Wechselwirkungen, sondern hat darüber hinaus einen Einfluss auf die angenommene Liganden-Konformation und damit auf die Bindungspose. Ein solches Ergebnis wäre bei einer anschließenden Wirkstoffoptimierung recht fehlleitend. Wie im vorliegenden Fall verfügen wir über übereinstimmende Daten aus entsprechenden 2D-NMR-Experimenten und nehmen an, dass unsere Kokristallisationsergebnisse das realistischere Bild der Bindungsgeometrien darstellen.^[109,110]

Ähnlich wie bei unseren Befunden konnte auch bei der Kinase Lyck im Komplex mit Staurosporin bei der *gesoakten* Kristallstruktur keine ausreichende Anpassung der Gly-reichen Schleife beobachtet werden. Die zu vergleichende kokristallisierte Struktur zeigte eine stärkere Anpassung dieser hochflexiblen Proteinregion.^[105]

Die Liganden **26** und **27** deuten darauf hin, dass der Einfluss des angewandten Kristallisationsprotokolls größenabhängig zu sein scheint und weniger die angenommene Geometrie beeinflusst, wenn ein kleines Fragment untersucht wird. Hier beobachteten wir praktisch identische Bindungsposen. Wir

glauben, dass zwei Gründe in diesem Zusammenhang wichtig sind. Erstens sind die Fragmente aufgrund ihrer geringeren Affinität in der Regel nicht potent genug, um größere, energetisch aufwändige Konformationsänderungen des Proteins zu induzieren. Zweitens weisen die größeren Liganden **20-25** eine ganze Reihe von Torsionsfreiheitsgraden auf, die energetisch jedoch leicht zu überwinden sind, so dass sich die Liganden während des *Soakings* an die Proteinpackungsumgebung anpassen können, die in vorgefertigten, unkomplexierten Kristallen vorzufinden ist (siehe Trypsin-Beispiel). Kandidaten für Fragmentbibliotheken werden in der Regel so ausgewählt, dass sie eine geringere Anzahl von Torsionsfreiheitsgraden aufweisen. Daher ist es wahrscheinlicher, dass Proteinstrukturen und Ligandbindungsmotive im Falle der kleinen Fragmente eine ausreichende Komplementarität aufweisen. Dadurch würde eine bessere Übereinstimmung der, nach den beiden Protokollen des *Soakings* und der Kokristallisation erhaltenen Kristallstrukturen beobachtet werden.

3.5 Fazit

Wegen der Zeit- und Kosteneffizienz ist das *Soaking* die beliebtere Methode zur Herstellung von Kristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen. Wir haben gezeigt, dass die aufwändigere Methode der Kokristallisation jedoch der überlegene Ansatz ist. Insbesondere für flexible Proteine, wie Kinasen und für größere Liganden wird angenommen, dass durch die Kokristallisation die korrekte Ligandbindungspose und die induzierten Proteinkonformationen besser erfasst werden können. Da wir bei einigen der in dieser Studie beschriebenen Komplexe auf in Lösung gesammelten NMR-Daten zurückgreifen können, sind wir uns über die getroffene Schlussfolgerung sicher. Die geometrischen Diskrepanzen der Strukturen, die aus *gesoakten* und kokristallisierten Kristallen erhalten werden, scheinen bei fragmentartigen Ligandmolekülen, mit einer begrenzten Anzahl von Torsionsfreiheitsgraden, geringer zu sein. Für größere und flexible Liganden, die Konformationsänderungen der Proteinstruktur auslösen, kann das *Soaking* jedoch ein irreführender Ansatz sein, der ohne Referenzdaten schwer zu beurteilen ist. Hierbei wird wahrscheinlich die Anzahl der möglichen polaren Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand aufgrund inadäquater, stark beeinträchtigter Positionen der Atome der Seitenketten und der Hauptkette der Protein-Aminosäuren unterschätzt. Deshalb sollte für die Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen die Kokristallisation der Standard sein. Diese Methode liefert den strukturellen Einblick in die äquilibrierten Protein-Ligand-

Wechselwirkungen und die angenommene komplexierte Konformation. Diese Aspekte sind für die rationale Planung der Wirkstoffoptimierung unerlässlich.

3.6 Experimentelle Durchführung

In diesem Abschnitt werden lediglich die für dieses Kapitel spezifischen experimentellen Durchführungen diskutiert. Die Proteinexpression- und aufreinigung, sowie die Aufnahme und Verfeinerung der röntgenkristallographischen Datensätze ist im Abschnitt **8 (Experimenteller Teil)** beschrieben. Außerdem befinden sich die kristallographischen Tabellen und die Auflistungen der berechneten RMSD-Werte im **Anhang (Abschnitt 9)**.

3.6.1 Kristallisation

Die Kokristallisationsprotokolle von **20**, **22-26** wurden bereits früher diskutiert.^[109,110,112] Daher wird hier nur über Unterschiede zu den *Soaking*-Protokollen berichtet. Die Kristallisation für die zum *Soaking* verwendeten Kristalle wurde mit der Methode des hängenden Tropfens bei 4°C durchgeführt. Die Kristallisationstropfen für **20** und **22-26** enthielten die folgenden Bestandteile: 10 mg/mL PKA (240 µM), 30 mM MBT (MES/Bis-Tris-Puffer pH 6.2-6.9), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 75 mM LiCl, 0.3 mM Mega-8, 0.7 mM PKI (Sigma Aldrich: P7739 für Kokristalle; Sigma Aldrich: SCP0064 für *Apo*-Kristalle für das *Soaking*), 120 µM oder 1.2 mM Ligand, gelöst in DMSO aus einem 50-100 mM Vorrat für Kokristalle, aber nicht für die *Apo*-Kristalle. Für **21** und **27** wurden geringfügig unterschiedliche Bedingungen angewendet: 8 mg/mL PKA (200 µM), 100 mM MBT (MES/Bis-Tris-Puffer pH 6.9), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 75 mM LiCl, 0.2 mM Mega-8, 0.5 mM PKI (Sigma Aldrich: P7739 für zu *soakende* Kristalle und Kokristalle) und 5 mM von **21** oder 14 mM von **27**, gelöst in DMSO aus einer 50-100 mM Stammlösung für die Kokristallisation. Die Vertiefungen der Kristallisationsplatten enthielten eine Mischung von Methanol in Wasser mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen für die verschiedenen Liganden (14-23% (v/v) Methanol). Für die Kristallisation wurde ein Animpfen mit *Apo*-Kristallen als initiale Kristallisationskeime unter Verwendung eines Pferdehaars durchgeführt. Das *Soaking* wurde für **20** und **22-26** über 24 Stunden in einem Puffer durchgeführt, welcher 30 mM MBT (MES/Bis-Tris-Puffer pH 6.9), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 75 mM LiCl, 16% (v/v) Methanol und 120 µM

Ligand (gelöst in DMSO) enthielt. Zur Vermeidung einer Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren der Proteinkristalle, wurden diese in einer Nylonschleife fixiert, durch einen Tropfen mit 5 mM MBT (MES/Bis-Tris-Puffer pH 6.9), 1 mM DTT, 0.1 mM LiCl, sowie 120 μ M oder 1.2 mM Ligand (50-100 mM in DMSO), 16% (v/v) Methanol und 30% (v/v) MPD gezogen. Für **21** wurde ein Puffer mit 30% (v/v) MPD und 70% (v/v) einer Lösung mit 100 mM MBT (MES/Bis-Tris-Puffer pH 6.9), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 75 mM LiCl, 0.2 mM Mega-8, 5 mM Ligand **21** in DMSO und 23% Methanol (v/v) verwendet. Im Fall von **27** wurden 100 mM unter den oben genannten Bedingungen aus einem 1 M DMSO-Vorrat gelöst und beide Kristalle (**21**, **27**) für 20 Minuten in diesen Puffern getränkt. Alle Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Kristallisationsvorschrift für **28** kann in der auf diesem Kapitel basierenden Veröffentlichung nachgelesen werden.^[87]

3.6.2 Überlagerung der Strukturen und RMSD-Analyse

Für die Erstellung der Abbildungen wurden Pymol^[113] und Chimera^[114] verwendet. Die Überlagerungen der Strukturen, sowie die RMSD-Berechnungen wurden mit der von MACLACHLAN entwickelten und in ProFitV3.3 implementierten Routine, basierend auf der *Methode der kleinsten Quadrate* durchgeführt.^[115,116] Für jeden Liganden wurden die Koordinaten von den Strukturen, die nach dem *Soaking* und nach der Kokristallisation erhalten wurden, miteinander verglichen. Dazu wurden alle C α Atome der folgenden Aminosäuren übereinander gelagert: 15-33, 38-48, 56-119, 124-330, 334-350. Aminosäuren, die nicht übereinander gelagert wurden, fehlten entweder als Koordinaten oder sind Teil der Gly-Schleife, die nicht berücksichtigt werden sollte, da die Betrachtung dieser flexiblen Region zu großen Abweichungen führen könnte. Nach dieser Überlagerung wurden RMSD-Werte für die Scharnierregion (120-123, C α Atome) und die Liganden (alle Atome) berechnet, wobei die durch die Kokristallisation erhaltenen Strukturen mit den durch das *Soaking* erhaltenen Strukturen verglichen wurden. Die Tabelle mit allen berechneten Werten ist im **Anhang (Abschnitt 9.3)** zu finden.

4. Frühzeitige Erkennung von kristallographischen Hits mittels Fluoreszenzspektroskopie

4.1 Einleitende Bemerkungen

In diesem Kapitel werden Fluoreszenz-Untersuchungen an Proteinkristallen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskop diskutiert. Diese Untersuchungen wurden mit der Unterstützung von PROF. CORNELIUS KRASEL durchgeführt. Mein Anteil war die Proteinexpression, -aufreinigung und -kristallisation, sowie die Vorbereitung der Fluoreszenzmessungen. Weiterhin habe ich zusammen mit PROF. CORNELIUS KRASEL die Fluoreszenzdaten aufgenommen und diese eigenständig ausgewertet. Ein weiterer Teil meiner Arbeit war die Aufklärung der Kristallstrukturen durch Röntgenbeugungsexperimente an einer Synchrotroneinrichtung und die Auswertung dieser Daten. Aus Redundanzgründen wurden nicht alle der hier verwendeten Datensätze in der PDB-Datenbank deponiert.

4.2 Einleitung

Ziele der Proteinkristallographie sind unter anderem die Aufklärung der Struktur von Proteinen und der Wechselwirkung von Liganden mit Zielproteinen. Die übliche Vorgehensweise beginnt mit der Kristallisation eines Zielproteins. Hierbei können die Züchtungsmethoden des hängenden und sitzenden Tropfens verwendet werden, welche auf dem physikalischen Prinzip der Dampfdruckdiffusion basieren. Außerdem ist es möglich den Ansatz der Kokristallisation oder des *Soakings* (deutsch: Tränken) zu verwenden. Bei dem ersten Ansatz wird das Protein in Gegenwart eines Liganden in geeigneten Pufferbedingungen kristallisiert. Im Falle des *Soakings* wird ein Kristall des *Apo*-Proteins (im folgenden „Apokristall“) in einer Ligandlösung getränkt, wodurch der Ligand in den Proteinkristall eindiffundiert und bei ausreichender Affinität an die Zieldomäne des Proteins bindet.

Besonders bei der schnelleren und ressourcensparenden *Soaking*-Methode werden große Bibliotheken an chemischen Verbindungen (u.a. Fragmentverbindungen) auf ihre Bindeeigenschaften an ein

Zielprotein überprüft. Nach Erhalt eines *gesoakten* Kristalls wird dieser unter geeigneten *Kryo*-Bedingungen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren und anschließend an einer Strahlungsquelle röntgenkristallographisch untersucht.

Die Messzeit für röntgenkristallographische Untersuchungen an einer Synchrotroneinrichtung ist begrenzt und auch die Auswertung dieser Daten bringt einen großen Aufwand mit sich, auch wenn dieser in den letzten 20 Jahren durch weitgehende Automatisierung deutlich zurückgegangen ist. Mithilfe der im Folgenden beschriebenen Methode wurde die Hoffnung verknüpft, die erfolgreiche Bindung eines Liganden an ein Zielprotein im Kristall zu identifizieren, ohne eine komplette Strukturauflösung durchzuführen. Dadurch müssten keine Datensätze aufgenommen werden, welche keine gebundenen Liganden aufweisen und somit unnötig wären. Das Prinzip ist vereinfacht in **Abbildung 4.1** gezeigt.

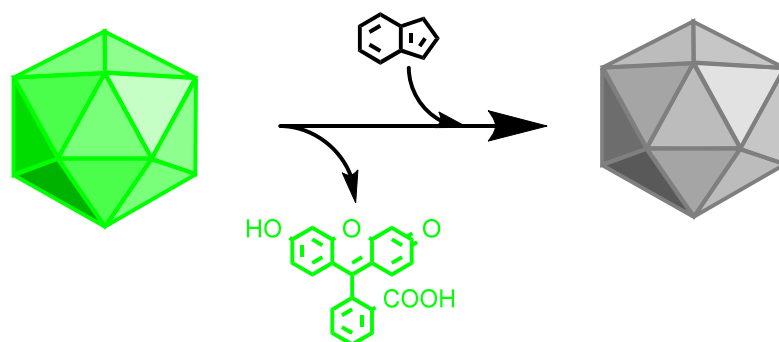


Abbildung 4.1: Prinzip der Verdrängung der Fluoreszenz aus einem Proteinkristall. Die chemischen Reporter- (grün) und Testverbindungen (schwarz) sind hier lediglich als Beispiele gewählt. Der zunächst fluoreszierende Kristall (grün) verliert seine Fluoreszenz-Eigenschaft (grauer Kristall) nach der Verdrängung des Reporter-Liganden durch die Testverbindung.

In einen Apokristall wird ein fluoreszierender Ligand *gesoakt*, welcher in Folge durch einen potentiellen Testliganden verdrängt werden soll. Vor der Verdrängung ist die Fluoreszenz im Kristall durch ein Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Danach sollte die Fluoreszenz erlöschen, da der verdrängte, fluoreszierende Reporter-Ligand aus dem Kristall in die umgebende Flüssigkeit diffundiert und dort

aufgrund seiner geringeren lokalen Konzentration keine bzw. eine deutlich geringere und kaum noch messbare Intensität der Emission aufweist, die zumal nach der möglichen Verdrängung bei einer anderen Wellenlänge erfolgen müsste. Durch dieses Verfahren könnte eine erfolgreiche Bindung eines Testliganden vor dem Vermessen an einer Synchrotroneinrichtung und vor der gesamten Auswertung bestimmt werden und wertvolle Zeit, sowie damit verbundene Kosten eingespart werden.

Die Vorgehensweise (Schema siehe **Abbildung 4.2**) startet mit dem oben benannten *Soaking* eines fluoreszierenden Liganden (Reporter-Ligand) in einen Ligand-freien Proteinkristall. Infolgedessen sollte der Proteinkristall fluorescent sein. Zur Überprüfung der Fluoreszenz muss der Kristall zunächst in eine Lösung gebracht werden, welche keinen Reporter-Liganden enthält und somit selbst nicht fluoreszierend ist. Nach diesem ersten Waschschrift sollten noch bis zu drei weitere Waschschriftte erfolgen, um die umgebende fluoreszierende Lösung vollständig vom Kristall abzuwaschen. Nun kann eine zuverlässige Bestimmung der Fluoreszenzemission durchgeführt werden. Entscheidend ist, dass diese Fluoreszenz tatsächlich in dem Inneren des Kristalls lokalisiert wird und somit eine Bindung des Reporter-Liganden anzeigt. Bei der Zugabe eines Testliganden wird in Folge einer erfolgreichen Verdrängung des Reporter-Liganden eine Auslöschung der Fluoreszenz erwartet, welche dann in einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Andernfalls zeigt das weitere Bestehen der Fluoreszenz eine ausgebliebene Verdrängung an.

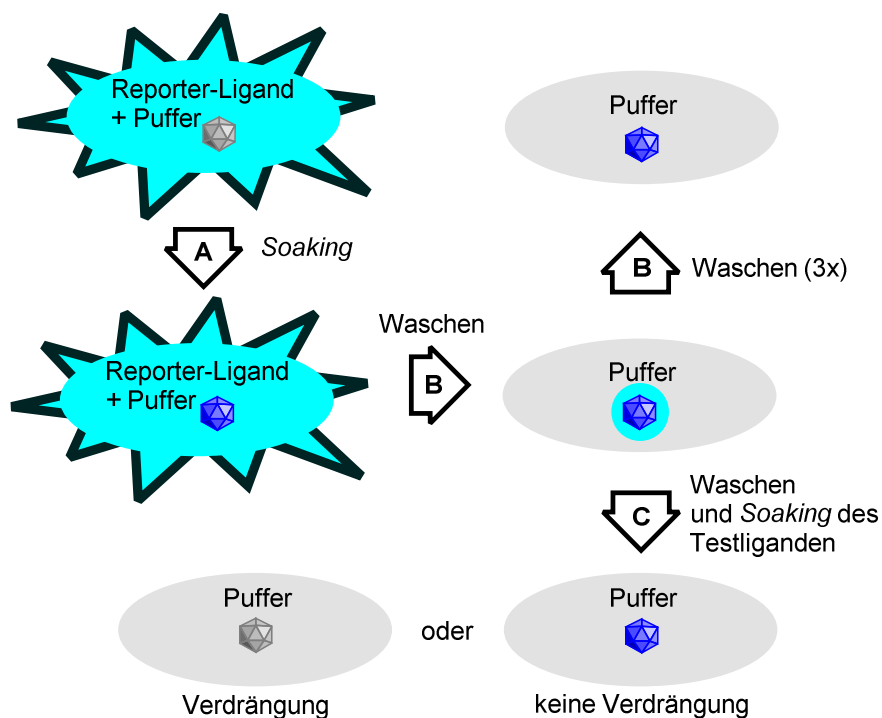


Abbildung 4.2: Prinzip des Verdrängungsexperimentes schematisch dargestellt. Die ovalen Formen stellen einen Tropfen der beschriebenen Lösungen auf einem Glasplättchen dar. **(A)** Ein nicht fluoreszierender Proteinkristall (grau) wird zunächst in den Reporter-Ligand enthaltenen Soaking-Puffer überführt. Der Kristall sollte nun ebenso wie der gesamte Tropfen fluoreszieren (blauer Kristall). **(B)** Um die Fluoreszenz voneinander abzugrenzen, wird die den Kristall umgebende, fluoreszierende Lösung mithilfe des Soaking-Puffers (ohne Liganden) abgewaschen. **(C)** Anschließend wird das Verdrängungsexperiment unter Zugabe eines Testliganden gestartet. Eine Verdrängung des Reporter-Liganden und die Bindung des Testliganden sollte durch eine Auslöschung der Fluoreszenz im Kristall angezeigt werden.

Nachdem die ersten Versuche dieses Projektes mithilfe einer Fluoreszenzlampe und später mit einem Fluoreszenzmikroskop keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich des Ursprungs des Fluoreszenzlichts lieferten, wurden die im nächsten Abschnitt beschriebenen Ergebnisse an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop erhalten. Die fluoreszierende Verbindung Aminosfasudil (**21**, Reporter-Ligand) wurde in PKI-haltige CHO PKA-Kristalle *gesoakt* und auf Fluoreszenzemission untersucht. Die Emission konnte durch die konfokale Anordnung des Experiments dem Inneren der Kristalle zugeordnet werden, wodurch eine erfolgreiche Bindung des Liganden zu vermuten war. Dies wurde später auch röntgenkristallographisch belegt (siehe Abschnitt **4.3 Ergebnisse und Diskussion**). Weitere Ergebnisse zu den Verdrängungsexperimenten sind im nachfolgenden Abschnitt aufgeführt.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

Eine Voraussetzung für diese Messreihe ist, dass CHO PKA-Kristalle ohne Reporter-Ligand keine Fluoreszenz aufweisen. Dies ist durch eine Messung eines Kristalls in einem Ligand-freien *Soaking*-Puffer (Zusammensetzung siehe **Tabelle 8.10** in **Abschnitt 8.2**) gegeben, da keine Fluoreszenz gemessen werden konnte. Der gleiche Kristall ist nach dem in **Abbildung 4.2** gezeigten Schema mit Aminofasudil (**21**) versetzt und gewaschen worden. Das Emissionsspektrum dieses Kristalls ist in **Abbildung 4.3** gezeigt (blaues Spektrum).

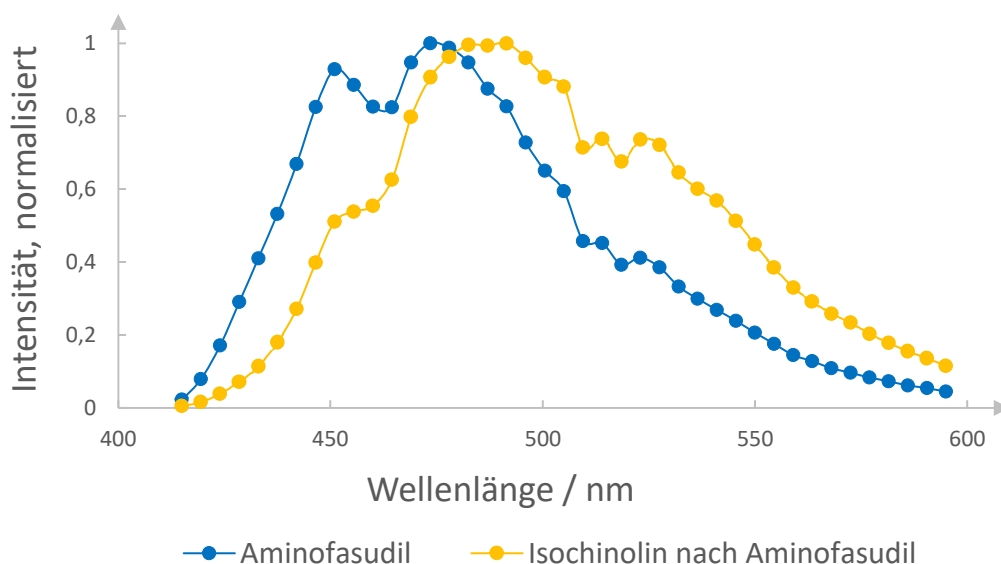


Abbildung 4.3: Emissionsspektren eines Kristalls nach dem Soaking mit dem Reporter-Liganden Aminofasudil (**21**) (blau) und nach anschließender Verdrängung mit dem Testliganden Isochinolin (**29**) (orange-gelb). Die Anregungswellenlänge beträgt 405 nm und die Emissionswellenlänge ist auf der x-Achse aufgetragen. Die Emissionsintensitäten sind normalisiert dargestellt.

Bevor das in **Abbildung 4.3** gezeigte Spektrum aufgenommen wurde, ist der Kristall bereits an einem nicht konfokalen Fluoreszenzmikroskop nach dem ersten Waschschrift untersucht worden. Die gemessene Fluoreszenz ist in **Abbildung 4.4 A**, mit dem Durchlicht-Bild übereinander gelagert, gezeigt. Der Kristall ist von fluoreszierender Lösung umgeben, welche farblos dargestellt ist. Es ist ebenfalls anhand der fluoreszierenden Lösung rechts vom Kristall zu erkennen, dass der Kristall bei der

Präparation von oben rechts zur Mitte des Bildes innerhalb des Tropfens gezogen wurde und etwas der fluoreszierenden Lösung in den neuen Tropfen übergegangen ist. Nach wiederholtem Waschen des Kristalls ist in **Abbildung 4.4 B** keine Fluoreszenz mehr im Tropfen messbar. Die fluoreszierende Lösung scheint vollständig vom Kristall abgewaschen zu sein. Der Kristall selbst weist jedoch weiterhin eine Fluoreszenzemission auf (vergleiche blaues Spektrum in **Abbildung 4.3** und Bild in **Abbildung 4.4 B**).

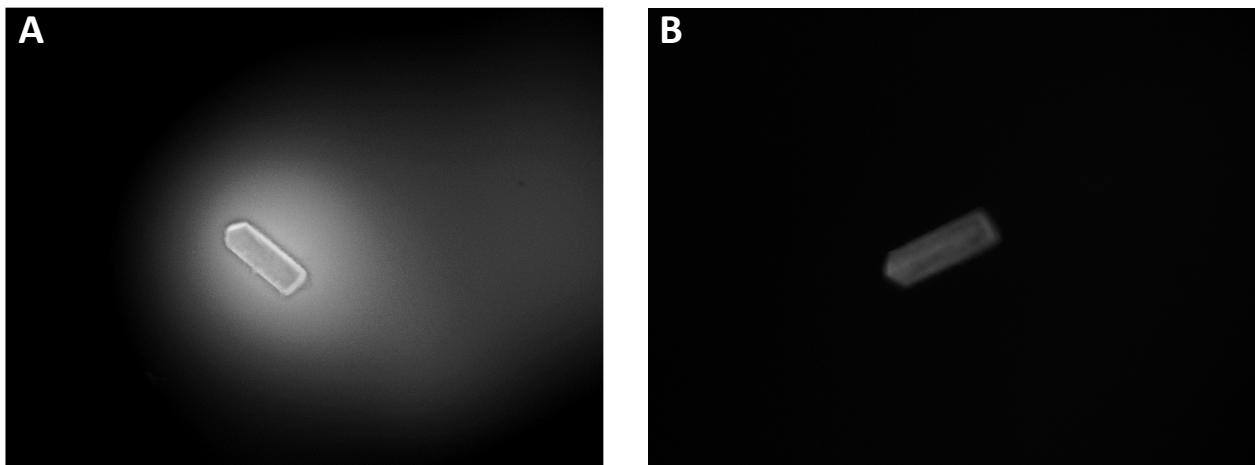


Abbildung 4.4: Überlagerung des Durchlichtbilds und der Fluoreszenzemission zweier mit Reporter-Ligand versetzten CHO PKA Kristalle. Die Fluoreszenz ist farblos dargestellt und schwarz deutet keine Fluoreszenz an. (A) Gezeigt ist ein Kristall nach dem Versetzen mit dem Reporter-Ligand und einmaligen Waschen im Soaking-Puffer. (B) Das Bild ist nach wiederholtem Waschen aufgenommen worden und zeigt einen Kristall, welcher weiterhin fluoresziert. Die umgebende Lösung weist dagegen keine Fluoreszenz mehr auf.

Ein Beleg dafür, dass die Fluoreszenz im Inneren des Kristalls zu lokalisieren ist, wird durch **Abbildung 4.5** deutlich. Hier ist der fluoreszierende Kristall dargestellt, nachdem dieser in einen Reporter-Ligand enthaltenen Soaking-Puffer getränkt und anschließend gewaschen wurde. Das konfokale Fluoreszenzmikroskop erlaubt das Fokussieren auf eine bestimmte Ebene des Kristalls. Daher sind in dieser Abbildung (**Abbildung 4.5**) mehrere Ebenen gezeigt um die Fluoreszenzemission aus dem Inneren des Kristalls zu verdeutlichen.

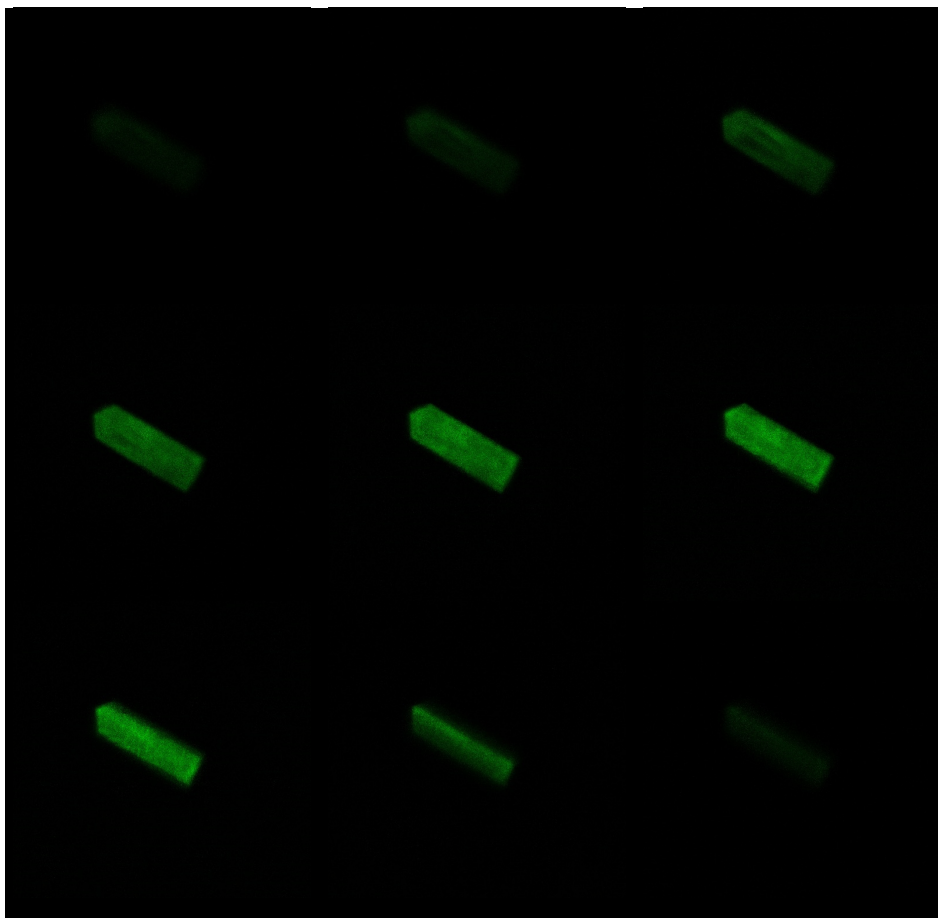


Abbildung 4.5: Änderungen der Fokusebene und Darstellung dieser verschiedenen Ebenen eines CHO PKA-Kristalls von oben links nach unten rechts. Der Kristall wurde zuvor in eine Reporter-Ligand (**21**) enthaltene Lösung getränkt.

Im Folgenden wird noch einmal auf das Experiment eingegangen, welches eingangs anhand von **Abbildung 4.3** beschrieben ist. Hier wurde zunächst ein Kristall in einer Lösung mit **21** getränkt (blaues Spektrum). Dieser wurde anschließend in einen *Soaking*-Puffer mit Isochinolin (**29**) überführt (orange-gelbes Spektrum). Die Änderung des Emissionsspektrums nach der Zugabe von **29** könnte auf eine Verdrängung von **21** zurückzuführen sein. Da **29** im Kristall nahezu keine Fluoreszenz aufweist (vergleiche **Abbildung 4.6**; Intensität nur etwa 1% der Emissionsintensität von **21** im Kristall) in diesem Experiment jedoch restliche Fluoreszenz gemessen wird, könnte dies auf einen Verbleib von **21** im Kristall (z.B. in den Lösungsmittelkanälen) hindeuten.

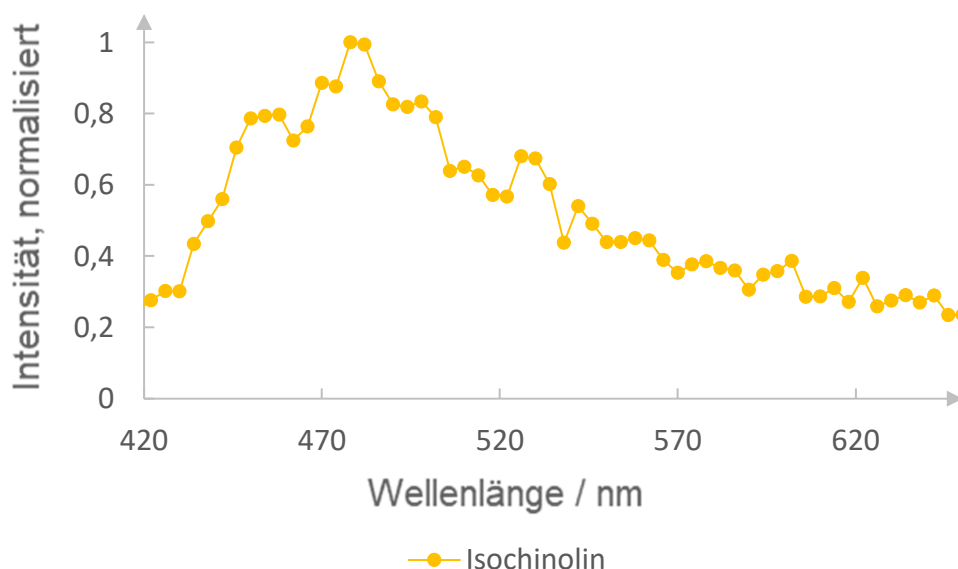


Abbildung 4.6: Emissionsspektrum eines CHO PKA-Kristalls mit dem Testliganden Isochinolin (29). Die Anregungswellenlänge beträgt 405 nm und die Emissionswellenlänge ist auf der x-Achse aufgetragen. Die Emissionsintensitäten sind normalisiert dargestellt und betragen nur etwa 1% der Intensitäten mit Aminofasudil (21).

Auffällig bei dem Vergleich der beiden Emissionsspektren in **Abbildung 4.3** vor und nach dem Verdrängen mit **29** sind vor allem die Peaks bei 451 nm und 523 nm. Vor dem Verdrängen von **21** weist die Fluoreszenzemission bei 451 nm eine deutliche höhere Intensität auf als nach dem Tränken im Isochinolin-Soaking-Puffer (**29**, 10-100 mM). Außerdem nimmt die Intensität des Emissionsmaximums bei 523 nm nach dem Tränken in diesem Puffer zu (orange-gelbes Spektrum). Daher wurde für jedes Spektrum das Verhältnis der normalisierten Intensitäten der Peakmaxima bei 451 nm (I_{451}) und 523 nm (I_{523}) gebildet, um eine Abschätzung des Unterschieds zu erhalten.

$$\text{Verhältnis} = \frac{I_{451, \text{norm.}}}{I_{523, \text{norm.}}} \quad (4.1)$$

Das Experiment ist mit drei, auf die gleiche Weise erhaltenen Kristalle durchgeführt worden. Für das erste Experiment (erster Kristall) ergibt sich ein Verhältnis von 2.3 (**21** gesoakt) gegenüber 0.7 (Verdrängung mit **29**). Gemittelt über alle drei Experimente ergibt sich ein Verhältnis von 2.0 (**21**

gesoakt) gegenüber 0.8 (Verdrängung mit **29**). Dies stellt einen signifikanten Unterschied dar und könnte bei zukünftigen Verdrängungsexperimenten für den Nachweis eines Treffers dienen.

Eine Verdrängung des Reporter-Liganden **21** aus der aktiven Tasche der PKA kann röntgenkristallographisch belegt werden. **Abbildung 4.7** zeigt die aktive Tasche von zwei Kristallen, deren Daten in zwei Röntgenbeugungsexperimenten unabhängig voneinander erhalten wurden, nachdem die Kristalle in einer Lösung mit **21** getränkt wurden. Die Bedingungen sind identisch zu den Versuchen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Das Experiment wurde mit zwei Kristallen wiederholt und diese anschließend in eine Lösung mit **29** getränkt.

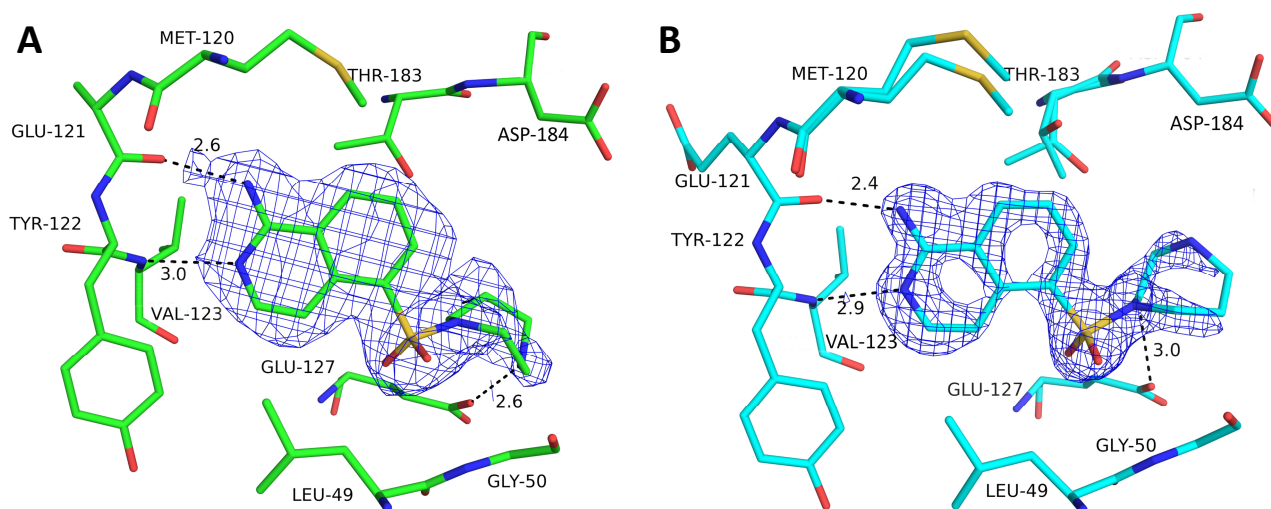


Abbildung 4.7: Aktive Tasche der PKA mit Aminofasudil (21**) in der Bindetasche.** Die Strukturen stammen aus Röntgenbeugungsexperimenten von zwei unabhängig voneinander erhaltenen Datensätze mit Auflösungen von 2.3 Å (**A**) und 1.5 Å (**B**). Die Elektronendichte ($2F_o - F_c$) ist bei einem RMSD-Level von 1σ dargestellt. In dieser und den folgenden Abbildungen sind die Heteroatome entsprechend ihres Typs kodiert (C: unterschiedlich für die einzelnen Komplexe, N: blau, O: rot, S: gelb). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien mit den Abständen in Å dargestellt.

Die auf diese Weise erhaltenen Datensätze sind in **Abbildung 4.8** nach der abschließenden Verfeinerung dargestellt. Es zeigt die erfolgreiche Verdrängung des Reporter-Liganden **21** durch den Testliganden aus der aktiven Tasche. Da die Bedingungen identisch zu den obigen sind, kann auch bei

den Fluoreszenzmessungen von einer Verdrängung des Reporter-Liganden aus der aktiven Tasche ausgegangen werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass der Reporter-Ligand **21** lediglich in den Lösungsmittelkanälen verbleibt. Weiterhin ist die Verschiebung des Spektrums (siehe **Abbildung 4.3**) von **21** in der aktiven Tasche in ein abweichendes Emissionsspektrum von selbigem in den Lösungsmittelkanälen zu erwarten.

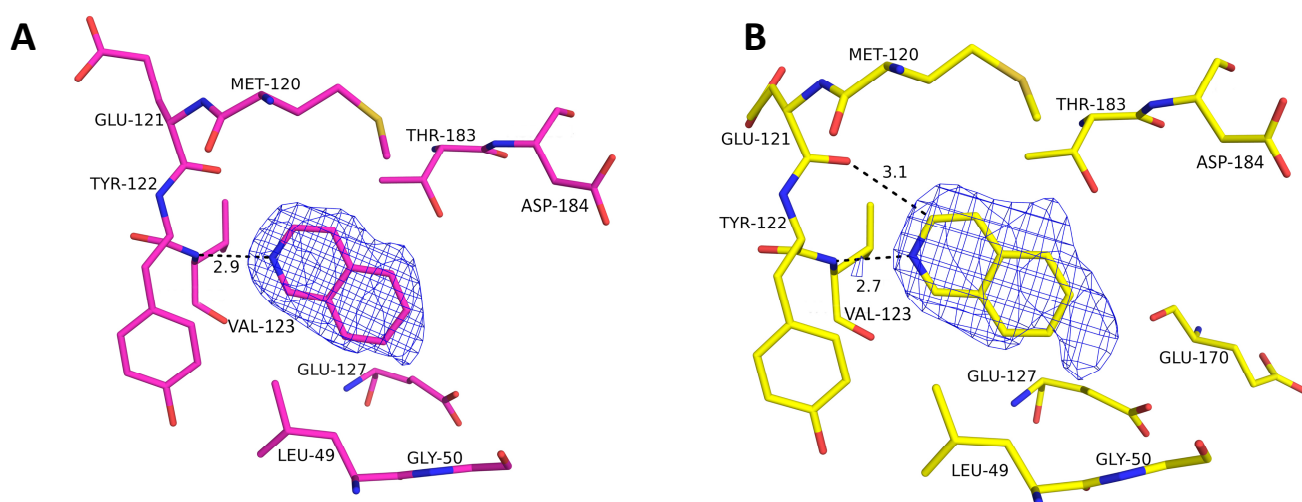


Abbildung 4.8 Aktive Tasche der PKA mit Isochinolin (**29**) in der Bindetasche nach dem Verdrängen von Aminofasudil (**21**). Die Strukturen stammen von zwei unabhängig voneinander erhaltenen Datensätze mit Auflösungen von 1.8 Å (**A**) und 2.1 Å (**B**).

Ein weiteres Experiment mit Staurosporin (**30**) als Testligand zeigt eine komplette Verdrängung des Reporter-Liganden **21**, bei welchem der Kristall keine Fluoreszenz mehr aufweist. Für diese Untersuchung wurde zunächst **21** mittels *Soaking* in einen Kristall gebracht. Durch Tränkung dieses Kristalls in den *Soaking*-Puffer mit **30** ist eine Auslöschung der Fluoreszenz erfolgt (vgl. **Abbildung 4.9**). In diesem Fall scheint **30** den Reporter-Liganden **21** auch aus den Lösungsmittelkanälen zu verdrängen.

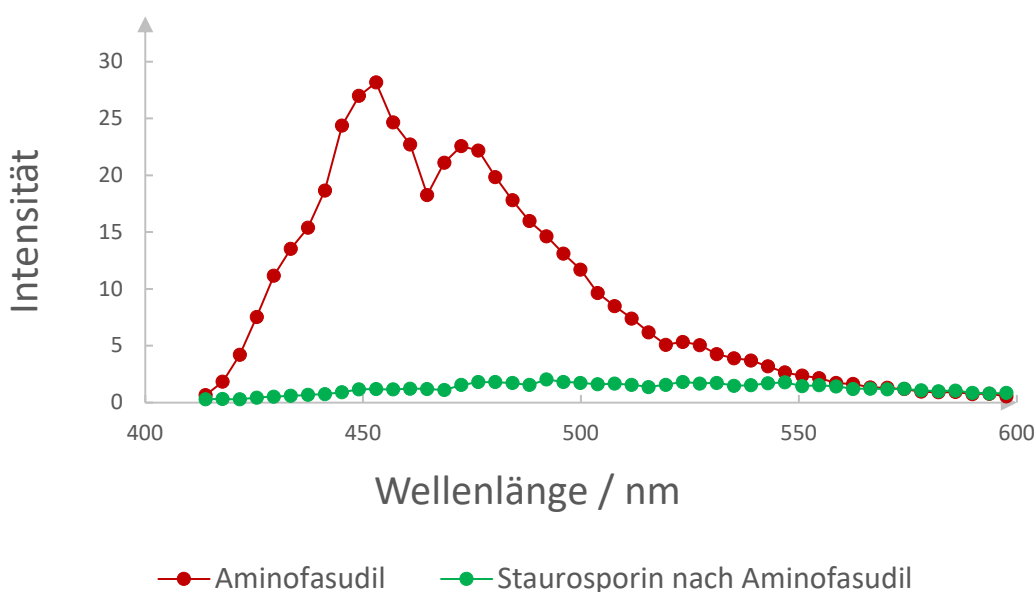


Abbildung 4.9: Emissionsspektren von einem PKA-Kristall mit Aminofasudil (21) und Staurosporin (30). Diese wurden nach dem Versetzen mit Aminofasudil (21, rot) und einem anschließenden Verdrängungsexperiment mit Staurosporin (30, grün) erhalten.

Da lediglich **29** und **30** als Testliganden verwendet wurden, ist eine endgültige Aussage über die zuverlässige Durchführbarkeit dieser Methode zum Nachweis einer Fragmentbindung nicht möglich. Beide Testliganden können erwartungsgemäß den Reporter-Liganden **21** aus der aktiven Tasche eines CHO PKA-Kristalls verdrängen. Diese Verdrängung ist durch die Fluoreszenzuntersuchungen naheliegend und konnte im Fall von **29** auch röntgenkristallographisch belegt werden. Letzteres scheint nicht in der Lage zu sein, **21** vollständig aus dem Kristall zu verdrängen. Es bleibt die Frage offen, ob dies mit den unterschiedlichen Affinitäten der Testliganden, deren Größen oder weiteren – noch nicht betrachteten Aspekten – zu begründen ist. Die Findung eines geeigneten Reporter-Liganden scheint jedoch eine große Herausforderung zu sein, weil viele Eigenschaften gegeben sein müssen. Neben der fluoreszierenden Eigenschaft, muss eine bestimmte Affinität zum Zielprotein gegeben sein, welche eine Verdrängung durch schwach bindende Testliganden ermöglicht. Weiterhin muss die Affinität hoch genug sein, damit der Ligand nicht mit der Zeit aus dem Kristall gewaschen wird. Dies könnte besonders bei langen *Soaking*-Zeiten zu einem Problem werden und führt dann möglicherweise zu falschen Treffer-Identifizierungen.

Für die CHO PKA scheint Aminofasudil (**21**) aufgrund seiner Eigenschaften ein geeigneter Reporter-Ligand zu sein. Die Findung solcher Reporter-Liganden für andere Zielproteine könnte sich als komplexere Aufgabe herausstellen. Dies gilt sicherlich besonders für wenig erforschte Proteine. Daher stellt sich die Frage der Effizienz: Ist es den Aufwand wert einen perfekten Reporter-Liganden für dieses Vorgehen zu finden? Wieviel Zeit und Ressourcen müssen hierfür aufgebracht werden und werden diese im Nachhinein signifikant eingespart? Schließlich ist es nicht sicher, ob ein geeigneter Reporter-Ligand für jedes Zielprotein gefunden werden kann. Auf der anderen Seite könnte diese Methode für bekannte Proteine mit etablierten Protokollen interessant sein. Für diese sollte, wie bei der CHO PKA, ein Auffinden geeigneter Liganden erleichtert sein. Ein Vergleich der aufzubringenden Zeit für die kristallographische und die fluoreszenz-basierte Methode zur Überprüfung einer erfolgreichen Fragmentbindung zeigt Folgendes: Eine Datensammlung mit anschließender Verarbeitung der Daten benötigt an einem hauseigenen Röntgengerät schätzungsweise ein bis zwei Tage. Das Ganze wäre für einen, an einer Synchrotroneinrichtung gemessenen Datensatz deutlich schneller und würde beispielsweise an einer *Beamline* des BESSY II unter zehn Minuten (bei vier Minuten für die Aufnahme eines Datensatzes) in Anspruch nehmen. Hinzu kommt noch die Zeit für die Verfeinerung, welche bei automatisierter Anwendung nur wenige Minuten für den Anwender in Anspruch nimmt. Synchrotroneinrichtungen an denen die Aufnahmezeit eines Datensatzes weniger als eine Minute beträgt, reduzieren die Zeit des gesamten Prozesses inklusive der Datenprüfung schätzungsweise auf über fünf Minuten. Diese Zeitangabe impliziert, dass ein leistungsstarkes Rechnersystem zur Verfügung steht und ein Datensatz innerhalb von zwei Minuten prozessiert werden kann. Dementgegen steht die hier vorgestellte Methode, welche lediglich die oben nicht betrachtete Handhabungszeit etwas verlängert, da der Kristall sukzessive in zwei bis drei anstelle von nur einen Tropfen überführt werden muss. Diese Zeit beträgt erfahrungsgemäß deutlich unter fünf Minuten. Hinzu kommen zwei Minuten, die der Kristall in der Reporter-Ligand-Lösung verweilen muss. Abschließend zu diesen Überlegungen lässt sich daher sagen, dass lediglich an einer Synchrotroneinrichtung mit einem hohen Photonenfluss ein ähnlicher zeitlicher Aufwand wie mit der hier vorgestellten Methode notwendig ist. Letztere wäre demnach vor allem dann sinnvoll, wenn eine Datensammlung beispielsweise am BESSY II oder dem eigenen Röntgengerät geplant ist.

In unserem Fall scheint der erste und alleinig untersuchte Reporter-Ligand **21** ein geeigneter Kandidat zu sein. Aus unseren Experimenten hat sich gezeigt, dass eine Verschiebung des Emissionsspektrums nach dem Verdrängen des Reporter-Liganden ebenso für eine *Hit*-Identifizierung wie die Auslöschung des Fluoreszenzlichts genutzt werden könnte. Jedoch bleibt die Frage offen, ob dieses Verhalten bei **29** einen Einzelfall darstellt. Daher müssten noch weitere Testverbindungen untersucht werden. Hierzu könnten nachgewiesene Nicht-Binder untersucht werden, welche **21** nicht verdrängen und somit keine Veränderung des Emissionsspektrums hervorrufen sollten. Eine weitere Frage bezieht sich auf die Menge an Reporter-Ligand in dem *Soaking*-Puffer. Es konnte in den Experimenten noch nicht geklärt werden, wie hoch die Konzentration innerhalb dieses Puffers gewählt werden sollte. Sinnig erscheint eine Menge die groß genug ist, die aktive Tasche zu besetzen, ohne dabei die Lösungsmittelkanäle gänzlich zu blockieren. Spielt hierbei die Größe des eingesetzten Kristalls eine entscheidende Rolle? Im Idealfall populieren Reporter-Ligandmoleküle ausschließlich die aktive Tasche des Zielproteins.

4.4 Experimentelle Durchführung

In diesem Abschnitt werden lediglich die für dieses Kapitel relevanten Methoden und Durchführungen erwähnt. Weitere Informationen zu der Expression, Aufreinigung und Kristallisation der CHO Proteinkinase A können in **Abschnitt 8 (Experimenteller Teil)** eingeholt werden.

Alle Aufnahmen der Emissionsspektren erfolgten nach einer Laser-induzierten Anregung (405 nm) durch Messung der Fluoreszenzemission mit einer Wellenlänge von 420-600 nm (Bandbreite 10 nm) unter Verwendung eines RT 30/70 Spiegels. Der Dioden-Laser des konfokalen Fluoreszenzmikroskops TCS SP5 wurde bei 900 V mit einer Intensität von 10% betrieben. Die *Soaking*-Zeiten betrugen fünf Minuten und Abweichungen entstanden lediglich, wenn ein Kristall nicht gut mithilfe einer Nylon-Schleife aufzunehmen war. Zur Überprüfung wurden Versuche über wesentlich längere Zeiten des *Soakings* (bis zu 1 h) angelegt, bei welchen aber keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

Für die Aufnahme des Emissionsspektrums eines CHO PKA-Kristalls ohne einen Liganden, wurde dieser in den *Soaking*-Puffer (Zusammensetzung siehe **Tabelle 8.10** in **Abschnitt 8.2**) ohne Ligandzugabe getränkt.

Das Spektrum (blau, **Abbildung 4.3**) eines Kristalls mit Reporter-Ligand wurde durch das Tränken in einem Aminofasudil-enthaltenen *Soaking*-Puffer (5 mM) vorbereitet. Weiterhin wurde dieser Kristall zum Waschen in den *Soaking*-Puffer ohne Liganden überführt. Das zweite Spektrum (orange, **Abbildung 4.3**) wurde nach dem Tränken desselben Kristalls in Isochinolin(**29**)-haltigem *Soaking*-Puffer (100 mM) und anschließendem Waschen aufgenommen.

Das mittels eines Leica DMI6000 B Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bild aus **Abbildung 4.4** wurde mit 100% Kamera-Licht für die Transmission und einer Wellenlänge von 470 ± 20 nm für die Fluoreszenzemission erhalten. Die Probe wurde bei einer Anregungswellenlänge von 360 ± 20 nm angeregt. Die Vorbereitung erfolgte analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise zur Aufnahme eines Kristalls mit Reporter-Ligand **21**.

Ein Emissionsspektrum mit dem Testliganden **29** im Kristall ist nach dem Tränken in dem Ligand-enthaltenen *Soaking*-Puffer (10 mM-200 mM) aufgenommen worden.

Für die röntgenkristallographischen Untersuchungen sind zwei Kristalle in einem *Soaking*-Puffer (5 mM) mit **21** für fünf Minuten getränkt worden. Ebenso wurde mit zwei weiteren Kristallen verfahren, welche anschließend für 5 Minuten in einem *Soaking*-Puffer mit **29** (100 mM) überführt wurden. Die vier Kristalle sind nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff an Synchrotron-Einrichtungen vermessen und die Daten ausgewertet worden (vgl. **Abschnitt 8.2**).

Der zweite Testligand Staurosporin (**30**) wurde für die Verdrängung von **21** verwendet (siehe **Abbildung 4.9**). Hierfür wurde zunächst ein Kristall in den *Soaking*-Puffer mit **21** (1-5 mM) und anschließend in einem *Soaking*-Puffer mit **30** (5 mM) getränkt.

5. Bindungscharakterisierung von Fragmenten basierend auf dem Wirkstoff Fasudil und dem natürlichen Substrat ATP an der Proteinkinase A

5.1 Einleitende Bemerkungen

Dieses Kapitel stellt eine Erweiterung meiner im Mai 2017 verfassten Masterarbeit^[117] mit dem Titel „Charakterisierung der Bindung von fragmentartigen Liganden an der Proteinkinase A“ dar. Zu diesen Erkenntnissen werden weitere Ergebnisse aus der Doktorarbeit von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT^[118] in den Auswertungsteil einbezogen. Mein Anteil dieses Projekts im Zuge meiner Doktorarbeit ist unter anderem die röntgenkristallographische Aufklärung von vier neuen Kokristallstrukturen (**27**, **33**, **36** und **39**). Dazu gehörte die Proteinexpression und -aufreinigung, sowie die Kristallisation der verschiedenen Liganden mit der PKA. Weitere drei Strukturen (**34**, **35** und **37**) wurden von mir bis zur Konvergenz der R-Werte verfeinert und in der PDB-Datenbank hinterlegt. Die Vorarbeit hierfür wurde von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT geleistet. Weiterhin habe ich fünf Liganden (**21**, **33**, **35**, **38** und **39**) auf ihre thermodynamischen Bindungseigenschaften an der PKA charakterisiert. Hierzu zählte die Proteinexpression und -aufreinigung, sowie die Bestimmung der Bindungsparameter mithilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie.

5.2 Einleitung

In diesem Projekt wurde eine Fragmentserie (siehe **Abbildung 5.1**) basierend auf dem bekannten Wirkstoff Fasudil (**20**) und Adenin (**31**), einem Baustein des natürlichen Substrats ATP (**32**), aufgestellt. Hierbei wurde die Serie nach möglichen Unterschieden zwischen den Bindungsmotiven der Fasudil-Fragmente und denen der ATP-Fragmente an der PKA untersucht. Ebenfalls denkbar ist ein konservierter Bindungsmodus über die gesamte Serie. Dies hat sich jedoch durch vorherige Ergebnisse nicht bestätigt, sodass die Unterschiede genau analysiert werden sollten. Zur Analyse diente zum einen die thermodynamische Betrachtung mittels ITC. Zum anderen wurde die röntgenkristallographische Untersuchung mittels Röntgenbeugungsexperimenten an Proteinkristallen zur Hilfe genommen.

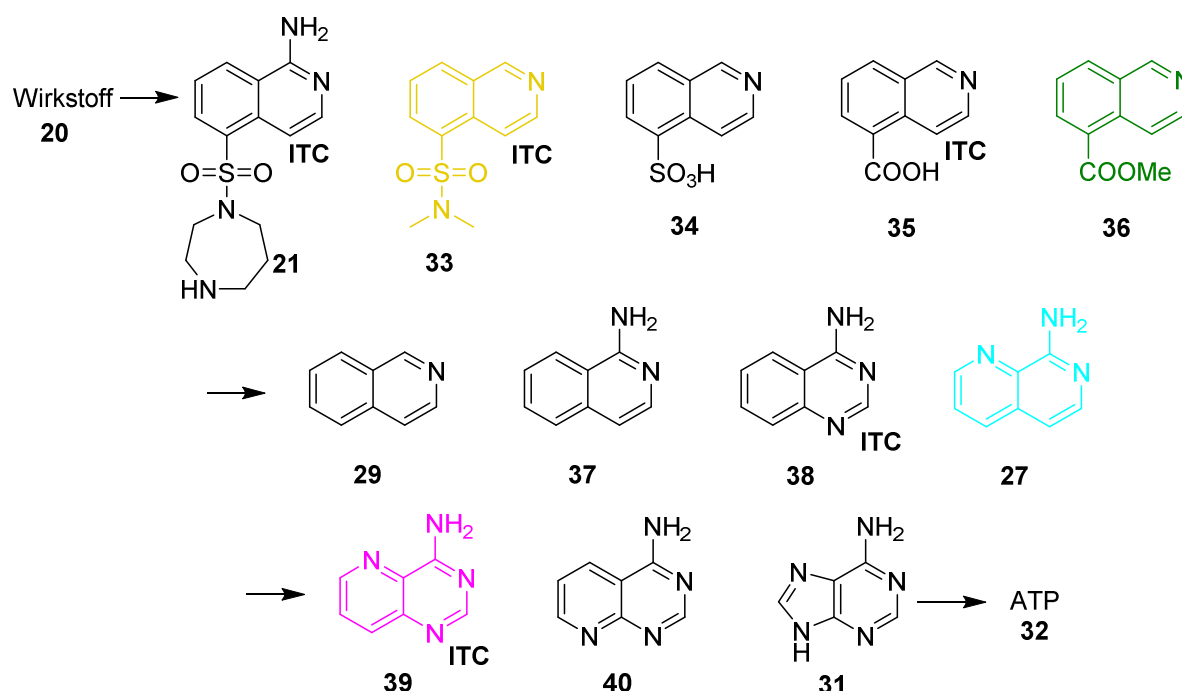


Abbildung 5.1: Darstellung der untersuchten Verbindungen als Strukturformeln. In dieser Serie sind 14 Verbindungen enthalten, von denen vier (farbig) in dieser Arbeit mit der CHO PKA kristallisiert und die Strukturen analysiert worden sind. Weiterhin sind die in dieser Arbeit mittels ITC untersuchten Verbindungen markiert (Zusatz: ITC). Die Serie startet mit dem Wirkstoff Fasudil (20). Eine weitere Fragmentierung und Modifizierung zum natürlichen Substrat ATP erfolgte in der Reihe: 21 – Aminofasudil, 33 – N,N-Dimethylisochinolin-5-sulfonamid, 34 – 5-Isochinolinsulfonsäure, 35 – 5-Isochinolincarbonsäure, 36 – 5-Isochinolincarbonsäure-methylester, 29 – Isochinolin, 37 – 1-Aminoisochinolin, 38 – 4-Chinazolamin, 27 – 1,7-Naphthyridin-8-amin, 39 – Pyrido[3,2-d]pyrimidin-4-amin, 40 – Pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-amin, 31 – Adenin, 32 – Adenosintriphosphat (ATP).

Der Grund für diese Studie ist die Frage nach möglichen Ansatzpunkten in der Wirkstoffentwicklung. Verglichen mit *Hit*-Identifizierungen aus *HT-Screenings*, wie sie bereits in **Abschnitt 1.1** beschrieben worden sind, bieten Fragmente die Möglichkeit zur Findung idealer Startpunkte für eine Wirkstoffentwicklung. Üblicherweise werden beim *HTS* größere Moleküle gefunden. Bei diesen ist nicht eindeutig zu erkennen, welche Seitenketten und Ligandmotive zu einer verbesserten Bindung beitragen und welche in Bezug auf ihre Bindungseigenschaften überflüssig sind. Aus einer Serie kleinerer Moleküle, wie Fragmenten können geeignete Kandidaten herausgelesen und zielgenau erweitert werden. Daher ist es interessant zu sehen, wie die Entwicklung des PKA-Wirkstoffs Fasudil

(**20**) auf Grundlage seiner Fragmente bewertet werden kann. Außerdem wurde das natürliche Substrat ATP (**32**) in kleinere Bausteine unterteilt und die erhaltenen Moleküle auf ihre Bindungseigenschaften untersucht.

Wie in **Abbildung 5.1** gezeigt, startet die Fragmentserie mit **20** und dem um eine Aminogruppe erweiterten **21**. Das Aufbrechen und Kürzen des 7-Rings führt zu *N,N*-Dimethylisochinolin-5-sulfonamid (**33**) und schließlich zu 5-Isochinolinsulfonsäure (**34**). Weiterhin wurden das Carbonsäure-Analogon (**35**) und der entsprechende Methylester (**36**) untersucht. Über das kleinste Fragment der Serie **29** werden durch das stufenweise Hinzufügen einer in 1-Position befindlichen Aminogruppe und weiteren endocyclischen Stickstoffatomen innerhalb der Isochinolineinheit, die Fragmente 1-Aminoisochinolin (**37**), 4-Chinazolamin (**38**), 1,7-Naphthyridin-8-amin (**27**), Pyrido[3,2-d]pyrimidin-4-amin (**39**) und Pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-amin (**40**) erhalten. Bei den Verbindungen **37-40** variieren die Anzahl und Positionen der Stickstoffatome. Letztlich schließt die Fragmentserie mit **31** ab, welches einen Baustein des ebenfalls untersuchten **32** darstellt.

Im nächsten Abschnitt sollen zunächst die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse vorgestellt werden. Anschließend werden diese im Diskussionsteil zusammen mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen aus meiner Masterarbeit und der Doktorarbeit von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT diskutiert.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die thermodynamische Bindungscharakterisierung des Liganden Aminofasudil (**21**) an der PKA erfolgte in einem TRIS-Puffer (siehe **Tabelle 5.6**). Nach dem Integrieren der gemessenen, exothermen Thermogramm-Signale (siehe **Abbildung 5.2** oben und im Anhang **Abschnitt 9.4**) ergibt sich bei einer Auftragung gegen das molare stöchiometrische Verhältnis (siehe **Abbildung 5.2** unten und im Anhang (**Abschnitt 9.4**)) ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Die Mittelung von drei Messungen ergibt einen stöchiometrischen Faktor von 0.89 ± 0.06 , $\Delta G = -34.9 \pm 0.1$ kJ/mol, $\Delta H = -36.7 \pm 0.3$ kJ/mol

und $-T\Delta S = 1.9 \pm 0.3$ kJ/mol. Aus dem inversen Wert der Steigung am Wendepunkt (K_B) ergibt sich ein K_D von 0.8 ± 0.1 μ M.

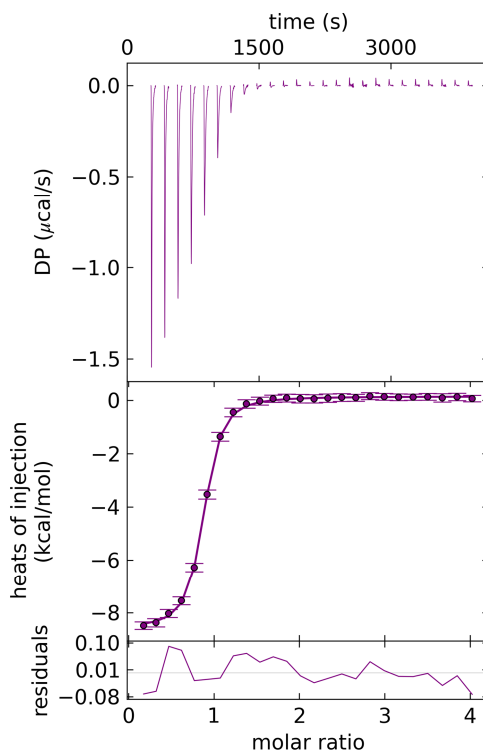


Abbildung 5.2: Thermogramm und Auswertung einer Titration von Aminofasudil (21) in eine PKA-Lösung. Aus dem Thermogramm (oben) wird nach Integration der Wärmesignale und Auftragung gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Protein ein sigmoidaler Kurvenverlauf (unten) erhalten. Diese Titration wurde in einem TRIS-Puffer durchgeführt.

Weitere ITC-Ergebnisse sind von den Verbindungen **33**, **35**, **38** und **39** erhalten worden. Ligand **33** konnte in einer direkten Titration vermessen werden. Die thermodynamischen Parameter sind $\Delta G = -28.0 \pm 0.4$ kJ/mol, $\Delta H = -35.3 \pm 1.9$ kJ/mol, $-T\Delta S = 7.3 \pm 2.3$ kJ/mol und der stöchiometrische Faktor beträgt 0.95 ± 0.02 . Für die Dissoziationskonstante wird aus der Auftragung ein Wert von $K_D = 12.6 \pm 1.8$ μ M erhalten.

Die thermodynamischen Bindungen von **35**, **38** und **39** an die PKA sind in einem Verdrängungsexperiment charakterisiert worden. Als Referenzwerte dienen die in meiner Masterarbeit ermittelten Werte für die Titration von **21** mit der PKA (vergleiche **Abschnitt 5.4**). Unter Anwendung der **Gleichungen 1.1-1.4** ergeben sich für Ligand **38** die folgenden thermodynamischen Parameter: $\Delta G = -20.3 \pm 2.1$ kJ/mol, $\Delta H = -5.2 \pm 3.3$ kJ/mol und $-T\Delta S = -15.1 \pm 5.4$ kJ/mol, stöchiometrischer Faktor = 0.85 ± 0.01 . Für Ligand **35** ergeben sich bei einem stöchiometrischen Faktor von 0.83 ± 0.07 die Parameter: $\Delta G = -19.9 \pm 1.2$ kJ/mol, $\Delta H = -14.0 \pm 3.5$ kJ/mol und $-T\Delta S = -5.8 \pm 4.5$ kJ/mol. Die Titration von **39** ergibt bei einem stöchiometrischen Faktor von 0.81 ± 0.02 Werte von $\Delta G = -18.5 \pm 0.7$ kJ/mol, $\Delta H = -9.3 \pm 0.7$ kJ/mol und $-T\Delta S = -9.1 \pm 1.2$ kJ/mol. Die drei Liganden weisen Bindungsaffinitäten in einer Größenordnung von 10^{-4} auf und die K_D -Werte sind: $K_{D,38} = 0.4 \pm 0.2$ mM, $K_{D,35} = 0.4 \pm 0.2$ mM und $K_{D,39} = 0.6 \pm 0.1$ mM.

Zur besseren Übersicht sind alle thermodynamischen Ergebnisse in **Tabelle 5.4** im Abschnitt **5.4 Auswertung und Diskussion** aufgeführt und werden mit den Ergebnissen aus vorherigen Arbeiten verglichen. In **Abbildung 5.3** sind die im Zuge dieser Arbeit bestimmten thermodynamischen Parameter grafisch dargestellt.

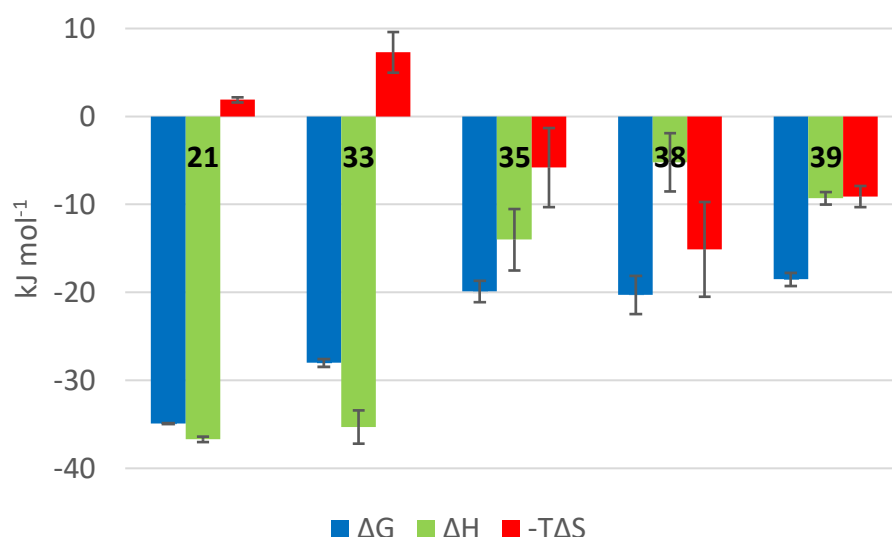


Abbildung 5.3: Veranschaulichung der mittels ITC bestimmten thermodynamischen Parameter.

5.3.2 Kristallographie

Aus der Fragmentserie (vgl. **Abbildung 5.1**) liegen vier weitere Kristallstrukturen der Verbindungen **27**, **33**, **36** und **39** im Komplex mit der PKA vor. Die vor dieser Arbeit erhaltenen Strukturen der Serie werden im Abschnitt **5.4 Auswertung und Diskussion** aufgelistet und mit den neuen Strukturen und ITC-Ergebnissen verglichen.

***N,N*-Dimethylisochinolin-5-sulfonamid (**33**)**

Das auf dem Wirkstoff Fasudil basierende Fragment **33** besteht aus einem Isochinolinring, welcher an 5-Position eine zweifach am Stickstoff methylierte Sulfonamid-Gruppe trägt. Ausgewählt wurde dieses Fragment, da es im Gegensatz zu seinem nicht methylierten Derivat ladungsneutral vorliegt und eine verbesserte Messbarkeit der thermodynamischen Bindungseigenschaften vermutet wurde. **33** bindet einmal in der aktiven Tasche der CHO Proteinkinase A und ein weiteres Mal außerhalb der Bindetasche. Im ersten Fall bildet der Ligand mit seinem Isochinolin-Stickstoff eine Wasserstoffbrückenbindung zum Val123NH des Peptidrückgrats (2.8 Å) aus und fungiert als Protonenakzeptor (siehe **Abbildung 5.4**).

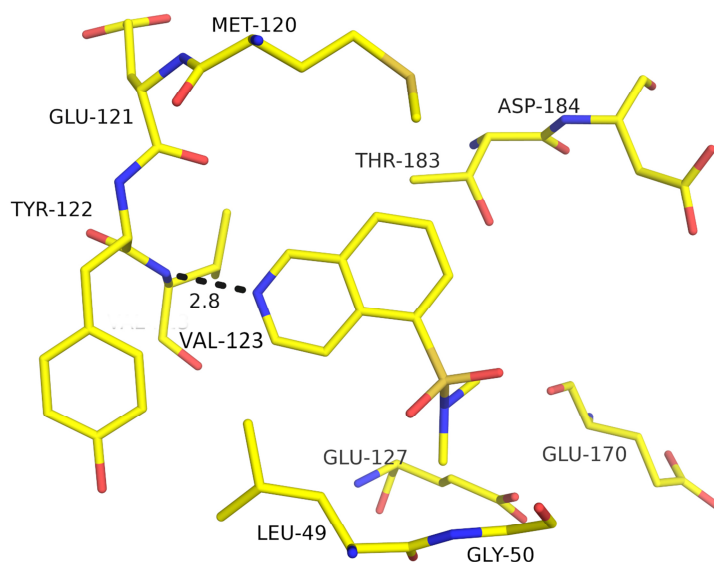


Abbildung 5.4: Bindungsmotiv von **33** an der PKA-Scharnierregion (PDB-Code: 6YOT). **33** bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Protein aus. Diese wird zwischen dem endocyclischen Stickstoff des

Liganden und dem Peptidrückgrat-Stickstoff von Val123 ausgebildet (2.8 Å). In dieser und den folgenden Abbildungen sind die Heteroatome entsprechend des Typs kodiert (C: unterschiedlich für die einzelnen Komplexe, N: blau, O: rot, S: gelb). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien mit den Abständen in Å dargestellt. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Der zweite Ligand (siehe **Abbildung 5.5**) bindet in einer Region, in welcher hydrophobe (Val15, Phe18) und aromatische (Phe18, Tyr306) Aminosäuren vorliegen. Weiterhin sind polare die Aminosäuren Lys292Nζ (2.9 Å) und Gln307Nε in Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Fragment involviert. Die Wechselwirkung zwischen Gln307Nε und einem Sauerstoff der Sulfonamid-Gruppe wird über ein Wassermolekül vermittelt (2.8 Å und 3.0 Å).

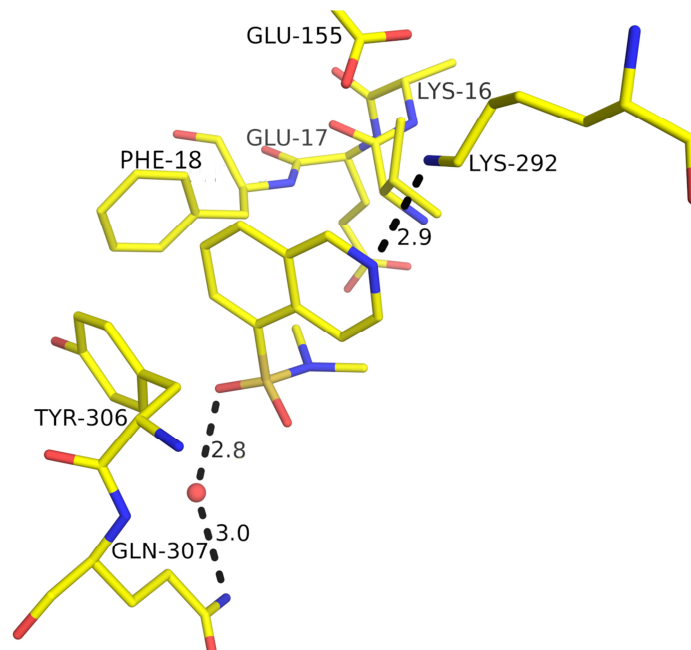


Abbildung 5.5: Zweites Bindungsmotiv von 33 an der PKA (PDB-Code: 6YOT). Der Ligand **33** bindet an zwei verschiedenen Positionen an der PKA. In der Umgebung dieser Position befinden sich neben hydrophoben (Val15, Phe18) und aromatischen (Phe18, Tyr306) Aminosäuren auch Lys292 (2.9 Å) und Gln307, welche eine Wasserstoffbrückenbindung zum Liganden ausbilden. Die Wechselwirkung zu Gln307Nε wird über ein Wassermolekül vermittelt (2.8 Å und 3.0 Å).

5-Isochinolincarbonsäuremethylester (36)

36 besteht aus einem an 5-Position substituierten Isochinolin und trägt an dieser Stelle eine Carbonsäuremethylester-Gruppe. Der Ligand liegt in zwei Konformationen bezüglich des Substituenten vor und die Isochinolingrundgerüste weisen nur eine geringfügige Abweichung voneinander auf. In beiden Konformationen bildet **36** mit seinem endocyclischen Stickstoff eine Wasserstoffbrückenbindung zu Val123NH (2.8 Å) aus. Eine Betrachtung des Substituenten in 5-Position zeigt den Estersauerstoff, welcher lediglich in einer Konformation eine wasservermittelte H-Brückenbindung zu Thr183O γ eingeht. Hierbei ist der Carbonsäuremethylester-Rest im Gegensatz zu der anderen Konformation um 135° gedreht. Beide Konformationen liegen mit einer Besetzung von 47% und 53% in etwa gleichen Teilen vor.

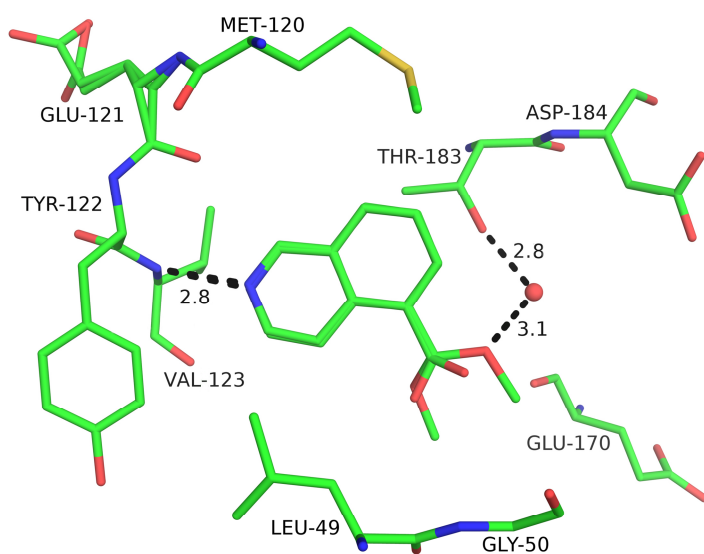


Abbildung 5.6: Bindungsmotiv von 36 an der PKA-Scharnierregion (PDB-Code: 6Y89). Der endocyclische Stickstoff bildet in beiden Konformationen des Liganden eine Wasserstoffbrückenbindung zu Val123NH aus (2.8 Å). In einer Konformation wechselwirkt zusätzlich der Estersauerstoff über ein Wasser verbrückt mit Thr183O γ (3.1 Å und 2.8 Å).

1,7-Naphthyridin-8-amin (27)

Das Fragment **27** besteht aus einem Isochinolin-Grundgerüst. Beide Sechsringe weisen einen endocyclischen Stickstoff auf und einer der beiden Sechsringe trägt zusätzlich eine exocyclische Aminogruppe. Dieser Sechsring ist bei der Bindung an die PKA in Richtung der Scharnierregion gerichtet, welche mit Glu121O und Val123NH in Wechselwirkung mit dem exocyclischen (3.0 Å) und endocyclischen (3.0 Å) Stickstoff steht. Der endocyclische Stickstoff des zweiten Rings bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu Thr183Oy in einer Distanz von 3.0 Å aus. Beide endocyclischen Stickstoffe fungieren als Protonenakzeptoren und der exocyclische Stickstoff als Protonendonator.

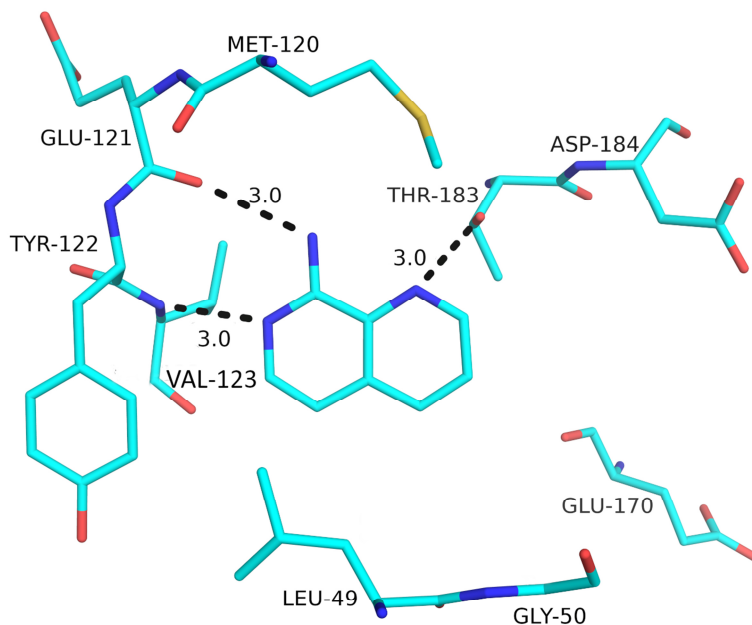


Abbildung 5.7: Bindungsmotiv von 27 an der PKA-Scharnierregion (PDB-Code: 6Y2O). Der Ligand bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Glu121 und Val123 der Scharnierregion aus. Weiterhin besteht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem endocyclischen Stickstoff des Liganden und Thr183. Alle Interaktionspartner befinden sich in einem Abstand von 3.0 Å zueinander.

Pyrido[3,2-d]pyrimidin-4-amin (39)

Ähnlich zu Ligand **27** besteht Ligand **39** aus zwei aromatischen Sechsringen, welche einen exocyclischen und zwei endocyclische Stickstoffe an denselben Positionen wie bei **27** aufweisen. Darüber hinaus befindet sich bei gleichem Bindungsmodus ein weiterer endocyclischer Stickstoff in dem zur Scharnierregion gerichteten Ring. Die Wechselwirkungsmuster sind identisch zu dem Liganden **27**, wodurch der zusätzliche Stickstoff keinen Interaktionspartner aufweist. Die Distanzen zwischen den wechselwirkenden Gruppen und der PKA sind identisch zu **27** für die zur Scharnierregion gerichteten Stickstoffe (3.0 Å). Ein minimaler Versatz führt bei der Interaktion von Thr183O γ und dem endocyclischen Stickstoff des Liganden zu einer Distanz der beiden Partner von 3.1 Å. Dieser Unterschied fällt jedoch in die Fehlergrenzen des Experimentes, wodurch das Bindungsmotiv verglichen mit obigem Beispiel (**27**) als identisch zu betrachten ist. Im Gegensatz zu den anderen Strukturen dieser Serie konnte diese Struktur lediglich mithilfe des *Soaking*-Ansatzes erhalten werden.

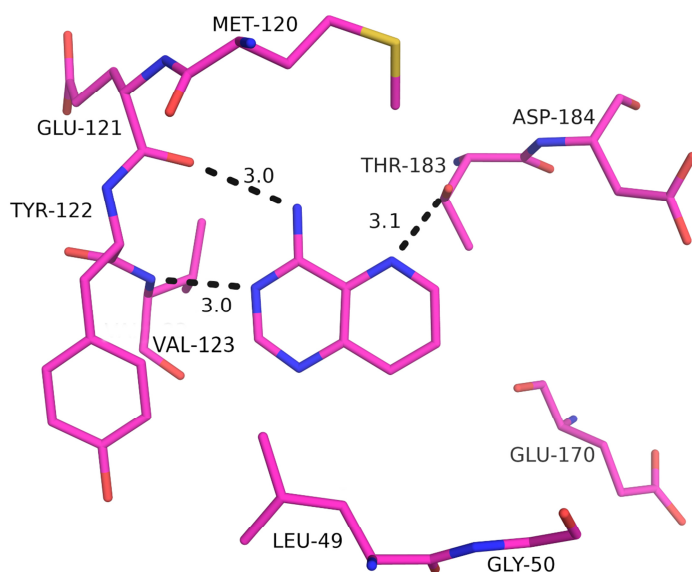


Abbildung 5.8: Bindungsmotiv von 39 an der PKA-Scharnierregion (PDB-Code: 6YOU). Der Ligand **39** bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen zu der PKA aus. Zwei Interaktionen bestehen zwischen endocyclischen Stickstoffen und Val123NH (3.0 Å), sowie Thr183O γ (3.1 Å). Der exocyclische Stickstoff wechselwirkt mit dem Peptidrückgratsauerstoff von Glu121 (3.0 Å).

5.3.3 Bestimmung der Reinheit von Liganden mittels qNMR

Die Reinheit der verwendeten Verbindungen sind in **Tabelle 5.1** aufgeführt. Die markierten Verbindungen wurden bereits im Zuge meiner Masterarbeit bestimmt und sind für eine bessere Übersicht mit aufgeführt. Die Bestimmungen erfolgten durch eine Aufnahme von qNMR-Spektren durch HANS-DIETER GERBER. Zwei Protonen von Maleinsäure mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 6.32$ ppm dienten als Referenz.

Tabelle 5.1: Auflistung der mittels qNMR bestimmten Reinheiten.

Verbindung	Reinheit [%]
21 ^[a]	96.7
29 ^[a]	100.0
31 ^[a]	99.7
33	95.4
34 ^[a]	94.0
36	97.4
37 ^[a]	96.2
38 ^[a]	98.3
27 ^[a]	98.1
39	98.6
40	97.4

^[a] Diese Werte wurden aus meiner Masterarbeit entnommen.

5.4 Auswertung und Diskussion

5.4.1 Auswirkung des Puffersystems auf die thermodynamischen Parameter

Bei kleinen Verbindungen und Fragmenten, wie sie in diesem Kapitel untersucht wurden, sind die enthalpischen Beiträge in ITC-Messungen zur thermodynamischen Bindungscharakterisierung aufgrund ihrer niedrigen Affinität und der geringen Anzahl an gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zu Zielproteinen zumeist ebenfalls gering. Allgemein werden bei Verbindungen, welche nur geringe Wärmesignale hervorrufen, große Proteinmengen benötigt, damit die Messgenauigkeit erhalten bleibt. Aufgrund dieses erhöhten Materialverbrauchs wurden die Protein-Liganden-Bindungen lediglich in einem Puffersystem (HEPES) untersucht. Für eine

Einschätzung von Puffer-abhängigen Protonierungseffekten der gesamten Serie bildete **21** eine Ausnahme, da dieser in vier verschiedenen Puffern auf die Bindungseigenschaften an der Proteinkinase A untersucht wurde.

Aus meiner Masterarbeit sind bereits die thermodynamischen Werte für die Messungen in den Phosphat-, HEPES- und TEA-Puffern bekannt. Da Messungen in dem Phosphat-Puffer zu großen Standardabweichungen im Vergleich zu den anderen Puffer-Messungen führten, wurden in dieser Arbeit zusätzliche Messungen in einem TRIS-Puffer durchgeführt. Die gemessenen Werte sind in **Tabelle 5.2** aufgeführt und zeigen nach Auftragung dieser Werte gegen die Ionisierungsenthalpien der Puffersysteme eine Steigung von -0.21 ± 0.01 (siehe **Abbildung 5.9**). Diese entspricht der Menge an Molen Protonen, welche pro Mol gebildetem Protein-Ligand Komplex an den Puffer abgegeben wird. Daraus ergibt sich ferner für die Bindung von **21** an die PKA ein reiner Enthalpie-Gewinn von -27.0 ± 0.3 kJ/mol. Die Differenz zwischen dem Enthalpie-Wert aus der Messung im HEPES-Puffer zum Puffer-korrigierten Wert beträgt 6.5 kJ/mol. Zunächst erscheint diese Abweichung groß bezüglich der üblichen Standardabweichungen (vergleiche HEPES-Puffer mit einer Standardabweichung von ± 0.8 kJ/mol). Dennoch können Aussagen innerhalb der Serie getroffen werden, solange, vor allem bei sehr kleinen Differenzen, die geringere Aussagekraft durch die Messung in nur einem Puffer berücksichtigt wird.

Tabelle 5.2: Thermodynamische Parameter der Bindung von 21 an der PKA in verschiedenen Puffersystemen. Sofern nicht anders angegeben, sind die Werte in kJ/mol angegeben.

Puffer (ΔH_{ion}) ^[119]	K_D [μ M]	ΔG_{Mittel}	ΔH_{Mittel}	$-T\Delta S_{Mittel}$
Phosphat (5.1)	0.9 ± 0.6	-34.8 ± 1.5	-26.9 ± 1.8	-7.9 ± 3.3
HEPES (20.4)	0.8 ± 0.1	-34.8 ± 0.4	-33.5 ± 0.8	-1.3 ± 1.2
TEA (33.6)	0.8 ± 0.2	-34.8 ± 0.5	-33.7 ± 0.5	-1.1 ± 1.0
TRIS (47.5)	0.8 ± 0.1	-34.9 ± 0.1	-36.7 ± 0.3	1.9 ± 0.3

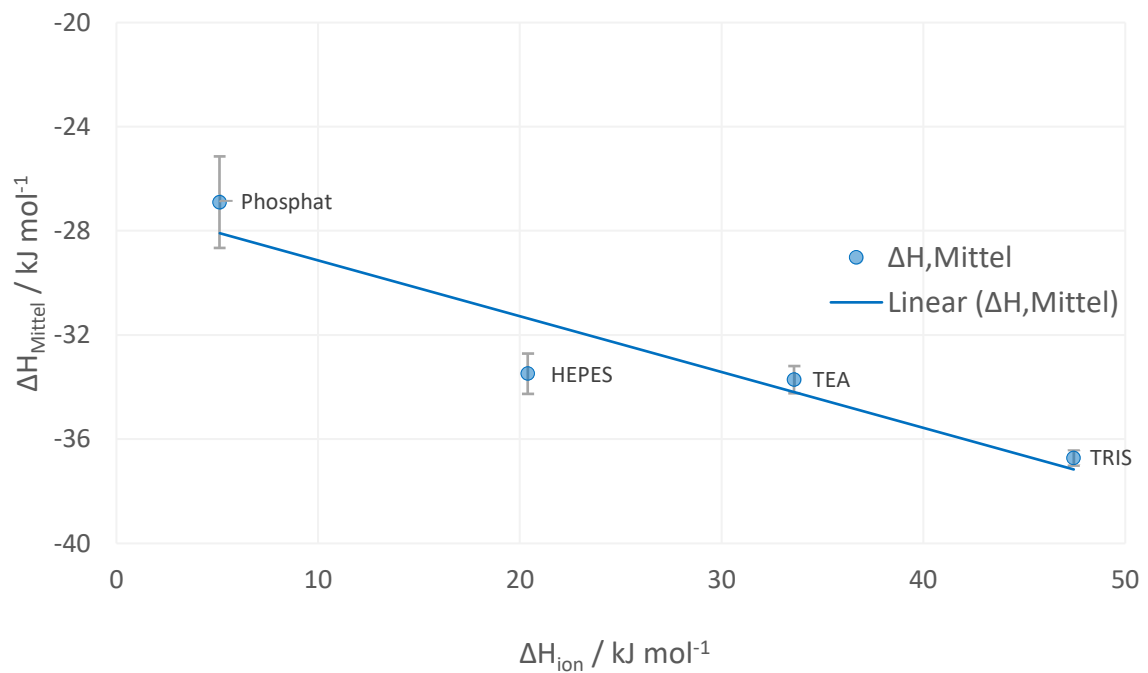


Abbildung 5.9: Auftragung der aus ITC-Messungen erhaltenen, gemittelten Enthalpie-Werte der Titration von 21 in eine PKA-Lösung verschiedener Puffersysteme. Hierbei sind die gemittelten Enthalpie-Werte gegen die Ionisierungsenthalpien der Puffer aufgetragen. Daraus wird der Puffer-unabhängige Enthalpie-Wert der Bindungsbildung bestimmt.

5.4.2 Kristallographische Betrachtung der PKA-Ligand-Bindungen

In diesem Abschnitt sollen die kristallographischen Erkenntnisse über die Bindung der Verbindungen an der PKA mit den thermodynamischen Untersuchungen verglichen werden. Die Liganden sind auf ihre Vergrabenheit in der aktiven Tasche der PKA untersucht und die Werte in **Tabelle 5.3** aufgelistet worden. In dieser Tasche sind die Liganden mit einem Prozentsatz von 88.8% bis 95.2% tief vergraben und zeigen somit nur eine geringe Lösungsmittelexposition.

Tabelle 5.3: Vergrabenheit von Liganden in der aktiven Tasche der PKA.

Verbindung	Vergrabenheit [%] ^[120]
20	91.0
21	89.1
27	93.8
29	94.8
31	95.2
32	89.8
33	91.8
34	90.5
35	91.0
36	90.9
37	88.8
38	89.5
39	92.1
40	-

Im Gegensatz zu den anderen Strukturen dieser Serie konnte die Struktur von **39** mit PKA lediglich mithilfe des *Soaking*-Ansatzes erhalten werden. Allerdings sollte gemäß **Kapitel 3** keine signifikante Änderung des Bindungsmodus auftreten, da **39** ein kleines Fragment mit wenigen Freiheitsgraden ist. Eine detaillierte Betrachtung der Bindungsmotive aller Fragmente wird mithilfe von **Abbildung 5.10** ermöglicht. Hier sind die Orientierungen der Fragmente zur Scharnierregion mit dem Wirkstoff **20** als Referenzligand und dem um 10° rotierten und um eine Aminogruppe erweitertem **21** schematisch dargestellt.

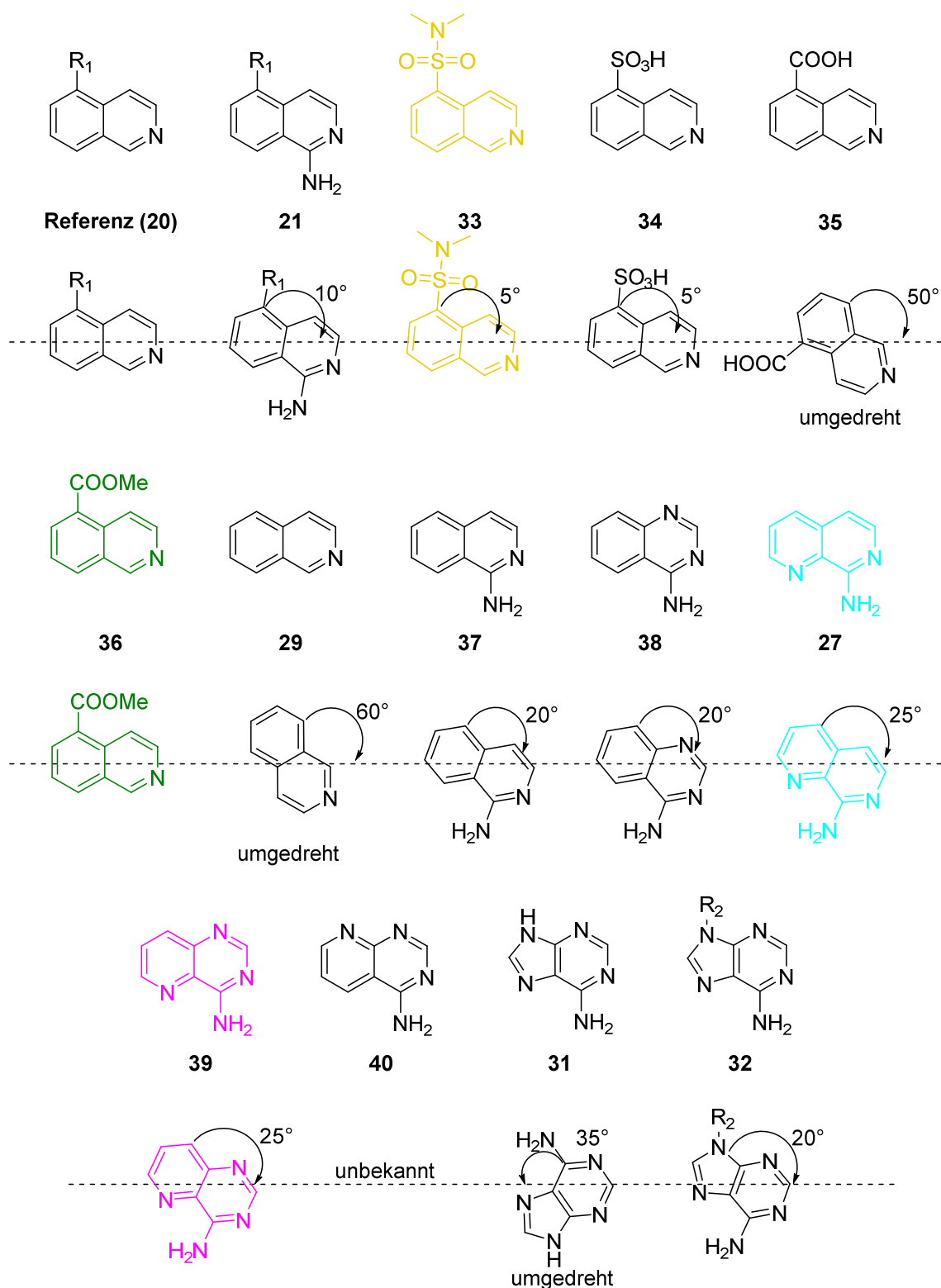


Abbildung 5.10: Orientierungen der Liganden an der Scharnierregion der CHO PKA. In diesem Schema werden die Orientierungen der Verbindungen aus der Fragmentserie an der Scharnierregion mithilfe von Rotationswinkeln dargestellt. Drei Fragmente (29, 31, 35) zeigen eine Bindung in umgedrehter Orientierung verglichen zu dem Referenzliganden Fasudil (20). R_1 und R_2 sind in **Abbildung 5.11** gezeigt.

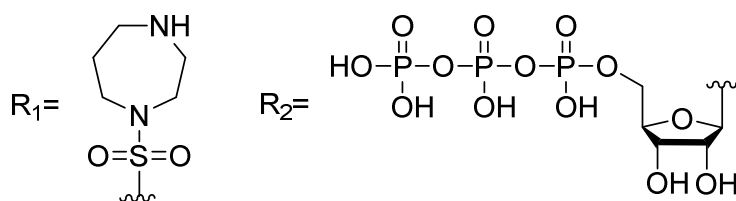


Abbildung 5.11: Strukturformeln der in vorheriger Abbildung nicht gezeigten Reste R_1 und R_2 .

Geringfügige Abweichungen der Bindungsmotive liegen bei den um 10° und 20° gedrehten Verbindungen **21**, **37**, **38** und **32** auf. Damit weisen **20**, **21** und **32**, welche die größeren Verbindungen der Serie darstellen, einen nahezu konservierten Bindungsmodus auf, was sich vermutlich auf sterische Aspekte zurückführen lässt. Ein Grund für den kleinen Versatz zwischen **20** und **21** könnte die Ausbildung einer zweiten Wasserstoffbrückenbindung von **21** zwischen dem exocyclischen Stickstoffs des Isochinolinrings und der Scharnierregion des Proteins (Glu121, 2.6-2.8 Å) sein. Weiterhin ist **33** als eine der größeren Verbindungen der Serie zu betrachten und bindet in der gleichen Orientierung, mit einem minimalen rotatorischen Versatz von 5° , wie **20** an der Scharnierregion. Die Konserviertheit der Bindung scheint in diesen Fällen entweder von sterischen Aspekten oder der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum Peptidrückgrat von Val123 bestimmt zu werden, da die Fragmente die größten der Serie darstellen und die Ausbildung einer H-Brücke zu Val123NH in jeder Fragmentstruktur zu finden ist.

Bei Betrachtung von **27** und **39** könnten die Ausbildungen von zwei H-Brücken (jeweils 3.0 Å) zur Scharnierregion der PKA mit Glu121O und Val123NH für eine ähnliche Bindung wie bei **20** (2.7 Å, 3.0 Å) verantwortlich sein. Der rotatorische Versatz beträgt in beiden Fällen 25° . Eine treibende Kraft für diese Orientierung könnte bei **27** auch die zusätzliche Ausbildung der H-Brücke (3.0 Å) zu Thr183O γ sein.

Mit **31** gibt es auch ein Beispiel, bei dem die in 1-Position befindliche Aminogruppe nicht für eine konservierte Bindung sorgen kann. Zusammen mit **35** und **29** führen diese Strukturen zu denen, mit der größten Abweichung bezüglich der Fragmentbindung an der Scharnierregion. Sie binden jeweils in

umgekehrter Orientierung und mit rotatorischem Versatz an die Scharnierregion (vergleiche **Abbildung 5.10**). **31** bindet unerwartet in einer stark abweichenden Orientierung zu **32**, welches **31** als Baustein enthält. Vermutlich ist das mittel-stark bindende ATP ($K_m = 4 \mu\text{M}$, vgl. **Kapitel 6**) nicht optimal in seiner Orientierung an der Scharnierregion ausgerichtet, sodass das sterisch wesentlich weniger anspruchsvolle Fragment Adenin ungehindert mit großer Abweichung an dieser Region bindet. Die nicht optimale Orientierung für **32** mit seinem Baustein Adenin an der Scharnierregion erscheint physiologisch sinnvoll, da nach der Phosphorylierung eines Substrats und bei starker Bindung von ATP bzw. ADP eine Inhibition der PKA auftreten würde. Das Beispiel von **29** zeigt, dass dieses sehr kleine Fragment eine unerwartet hohe Affinität zum Protein zeigt ($K_D = 30.5 \mu\text{M}$). Das ist insofern überraschend, da **29** lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung zum Protein ausbildet. Weiterhin ist die umgekehrte Orientierung und der rotatorische Versatz zu bemerken, welcher das kleine Fragment als Grundgerüst von Fasudil und ATP aufweist und vermutlich die optimale Bindung zu Val123NH ausbildet. Diese Vermutung beruht darauf, dass **29** keinen Substituenten trägt und daher sterisch und elektronisch möglichst ungehindert an die Scharnierregion bindet.

Das dritte, in unerwarteter Orientierung bindende Fragment ist **35**, welches in der aktiven Tasche der PKA aufgrund seiner Carbonsäure-Funktion geladen vorliegen sollte. Überraschend ist die Orientierung vor allem deshalb, weil das ebenfalls geladene **34** eine zum Referenzliganden konservierte Bindung zeigt. Eine detaillierte Betrachtung der beiden Strukturen zeigt die Ausbildung einer H-Brücke eines Carboxylsauerstoffs von **35** mit Thr183O γ (2.7 Å). Diese Wechselwirkung wird in der Struktur mit dem Sulfonsäure-Derivat **34** nicht ausgebildet. Ein Grund für die unterschiedlichen Orientierungen (siehe **Abbildung 5.12**) könnte der größere sterische Anspruch der Sulfonsäuregruppe sein, welche eine alternative Orientierung verhindert. Vermutlich wäre der Abstand zu Thr183 zu kurz und eine Wechselwirkung wäre daher energetisch ungünstig. In diesem Zusammenhang ist auch die Struktur des methylierten Carbonsäure-Derivats **36** interessant, da hier das Bindemotiv analog zu dem von **34** ist. Die Aufhebung der Ladung und die Erhöhung des sterischen Anspruchs durch das Hinzufügen der Methylgruppe könnten Gründe für die erneute Bindungsänderung sein. Es erscheint jedoch nicht sinnvoll, dass eine Ladungsänderung für das Ausbleiben einer Wechselwirkung zu Thr183 verantwortlich ist, da Thr183O γ als Protonendonator weiterhin eine Wechselwirkung mit dem Carbonylsauerstoff der

Esterfunktion als Protonenakzeptor über eine H-Brücke eingehen kann. Demnach könnte der minimal erhöhte sterische Anspruch der entstandenen Estergruppe im Vergleich zur Carbonsäuregruppe als Grund für die alternative Bindung angesehen werden. Diese Erhöhung wird hier als minimal bezeichnet, da eine Methylgruppe die kleinste, ladungsneutrale Gruppe zur Erweiterung von chemischen Verbindungen ist, ohne dabei Ladungsverteilungen stark zu beeinflussen.

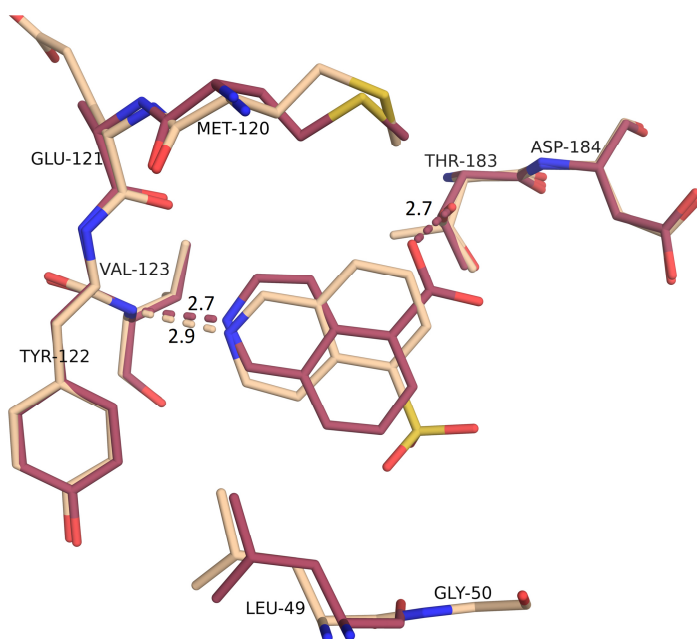


Abbildung 5.12: Überlagerung der Kokristallstrukturen von **34 (beige) und **35** (rot).** Dieser Ausschnitt zeigt die aktive Tasche der PKA. **34** (2.9 Å) und **35** (2.7 Å) bilden eine H-Brücke zu Val123NH aus. Zwischen **35** und Thr183 wird eine weitere H-Brücke (2.7 Å) ausgebildet, da der Ligand in einer umgekehrten Orientierung bindet.

Die bisherige Betrachtung der Strukturen bezog sich ausschließlich auf die aktive Tasche der PKA. Im Folgenden sollen wichtige Motive dieses Proteins und der in der Kokristallisation verwendete peptidische Pseudosubstrat-Inhibitor (PKI) diskutiert werden. Ein Vergleich von allen Strukturen ist in **Abbildung 5.13** gezeigt. Zu dem wichtigsten Motiv zählt die Glycin-reiche Schleife, welche aus den Aminosäuren Gly50-Arg56 besteht und eine hohe Flexibilität aufweist (vgl. **Kapitel 3**). Für diese Serie sind die Abweichungen dieses Motivs jedoch relativ gering. So zeigt die Seitenkette von Phe54 lediglich in den Strukturen **20**, **37** und **38** eine Orientierung in Richtung der aktiven Tasche. Für **20** tritt an dieser

Stelle die größte Abweichung auf, da Phe54 in dieser Struktur mit seinem Phenylring um etwa 1.5 Å versetzt ist. In den Fällen, in welchen die Seitenkette von Phe54 nicht in Richtung der aktiven Tasche zeigt, versperrt sie den Ein- und Ausgang dieser Tasche, in welche die Fragmente dennoch diffundieren und an das Peptidrückgrat der Scharnierregion binden. Mit Ausnahme von **31** wäre in allen weiteren Strukturen genug Platz für diese Seitenketten-Drehung vorhanden und würde zu keinem Konflikt mit dem jeweiligen Liganden führen. Dennoch liegt diese Orientierung nur in den drei oben genannten der insgesamt 14 Fällen vor. Bei **34** ist die Gly-Schleife am weitesten nach unten in Richtung Ligand gezogen, ohne mit diesem eine Wechselwirkung einzugehen. Dieser atomare Versatz von 1-3 Å bezieht sich lediglich auf die Aminosäuren Thr51-Ser53, wohingegen der restliche Teil dieser Schleife (Aminosäuren Phe54-Arg56) keinen signifikanten Versatz aufweist.

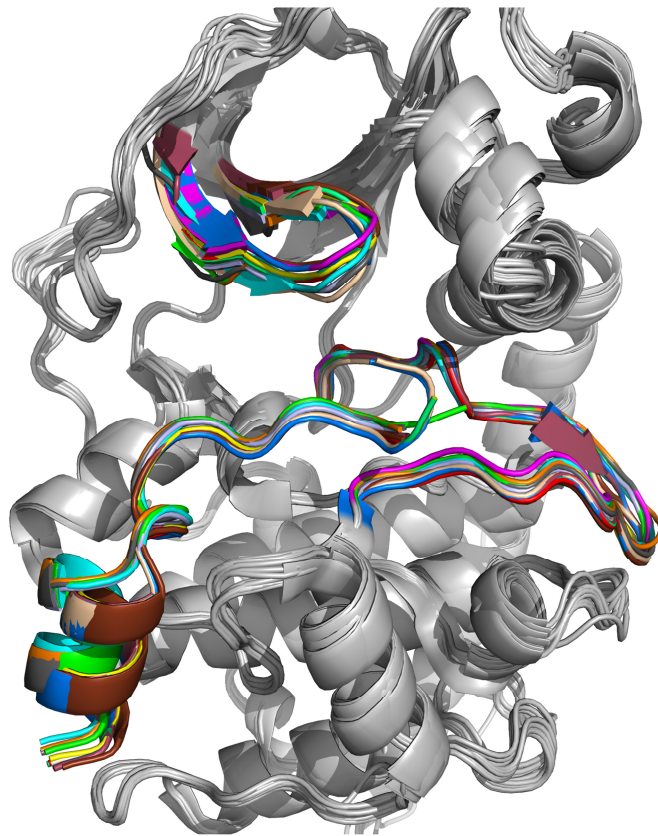


Abbildung 5.13: Überlagerung der gesamten Strukturen dieser Serie. Hierbei ist die Gly-reiche Schleife, die Aktivierungsschleife und das Peptid PKI farbig für die einzelnen Komplexe markiert. Auf den ersten Blick gibt es keine großen Unterschiede zwischen den Strukturen. In grau sind die Proteinhauptketten dargestellt. In dieser und der nächsten Abbildung ist der Farbcode wie folgt: **20** (blau), **21** (braun), **27** (cyan), **29** (orange), **31** (grau), **32** (hellgrau), **33** (gelb), **34** (beige), **35** (dunkelrot), **36** (grün), **37** (rot), **38** (türkis-grün), **39** (pink).

Ein weiteres Motiv ist die Aktivierungsschleife der PKA, die bei einer ersten Betrachtung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Hauptkettenatome aufweist. Beim Vergleich der Seitenketten fallen jedoch Unterschiede in den verschiedenen Strukturen bezüglich der Aminosäure Asp184 auf. Im Fall von **20**, **21** und **31** ist die Seitenkette in Richtung der Bindetasche orientiert und weicht somit zu den weiteren Strukturen ab, in welchen Asp184 eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Peptidrückgrat-Stickstoff von Gly186 ausbildet. Allerdings wird nur bei **20** eine Wechselwirkung mit dem Liganden und Asp184 beobachtet.

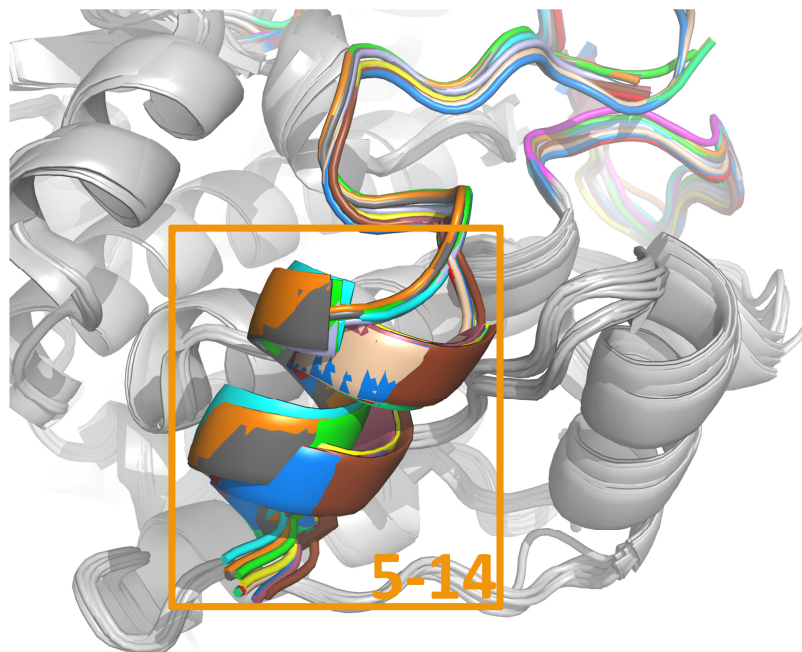


Abbildung 5.14: Überlagerung der gesamten Strukturen der Serie mit Fokus auf die Orientierung des Peptids PKI. Hierbei stehen die unterschiedlichen Orientierungen der farbig markierten PKIs im Vordergrund. Jede Farbe steht für einen anderen Fragmentkomplex. Im Hintergrund sind außerdem die farbig dargestellte Aktivierungsschleife und ein Teil der Gly-Schleife gezeigt. In grau sind alle übereinandergelagerten Proteinhauptketten dargestellt. Das orangene Kästchen zeigt den Bereich der Aminosäuren 5-14 des PKIs an.

Allgemein erscheint der C-Terminus des PKIs ungeordnet, sodass die Elektronendichte an dieser Stelle zumeist sehr schlecht definiert ist. Unterschiede in den verschiedenen Strukturen sind zum einen an der Aminosäure Arg18 des PKIs festzustellen. Hier zeigt die Seitenkette lediglich bei **20**, **34**, **35** und **38**

in Richtung des gebundenen Liganden, ohne dabei eine Wechselwirkung zu diesem auszubilden. In den restlichen Strukturen zeigt diese Seitenkette in eine, von der aktiven Tasche abweisende Richtung. Große Diskrepanzen ergeben sich für den N-Terminus des Peptids, bei welchem zwei verschiedene Orientierungen auftreten. Eine gemeinsame Orientierung liegt in den Strukturen **27, 29, 31, 32** und **36** vor und betrifft vor allem die Aminosäuren Thr5-Gly14 des PKIs. In den weiteren Strukturen liegt eine zweite Orientierung dieser Aminosäuren vor, die zu einer Verschiebung der Aminosäuren Phe239-Gln242 in den Proteinhauptketten führt. Die **Abbildung 5.14** zeigt beide Gruppen von Peptiden, welche jeweils innerhalb einer Gruppe in der gleichen Weise zu der PKA orientiert sind. Detailliert betrachtet erfolgt die Verschiebung aufgrund von Asp241, bei dem es andernfalls zu einem sterischen Konflikt zwischen der Seitenkette und PKI-Rückgratatomem kommen würde.

Die unterschiedliche Bindung des PKIs und die Länge der Kanten c der Einheitszellen scheinen in Korrelation zu stehen, da nur in manchen Fällen ein Versatz der Aminosäuren Phe239-Gln242 des Proteinrückgrats und eine damit einhergehende Änderung der Einheitszellen erfolgt. Dieser Versatz kann mit den beiden Reihen **20, 21, 27, 33, 34, 35, 37, 38** und **29, 31, 32, 36** in Verbindung gebracht werden. Hierbei weist die erste Reihe jeweils eine vergleichsweise große Achsenlänge c der Einheitszelle auf (106.1-109.5 Å) und in der zweiten haben die Strukturen eine deutlich geringere Achsenlänge c (80.8-88.4 Å). Der Versatz der Aminosäuren Phe239-Gln242 ist ausschließlich in der ersten Reihe zu beobachten. **39** wird in dem Vergleich nicht betrachtet, da diese Struktur ohne PKI erhalten wurde. Allerdings passen die Aminosäuren Phe239-Gln242 von **39** besser zu der Serie mit **29, 31, 32** und **36**, in welcher kein Versatz des Proteins erfolgt. Eine Ausnahme in der ersten Reihe bildet **27**, da hier trotz der großen Achsenlänge der Einheitszelle keine Verschiebung der Aminosäuren Phe239-Gln242 durch das PKI stattfindet, welches außerdem in ähnlicher Position wie **29, 31, 32** und **36** bindet.

Dementgegen scheinen die beiden diskutierten Motive (Gly-Schleife und Aktivierungsschleife) keinen strukturellen Einfluss auf andere Teile des Proteins zu haben.

5.4.3 Auswertung der thermodynamischen Bindungsparameter und Vergleich mit den kristallographischen Ergebnissen

Im Folgenden werden auch die thermodynamischen Bindungsparameter aus den ITC-Messungen in den Vergleich mit aufgenommen. **Tabelle 5.4** zeigt mit **20** den Liganden mit der höchsten Affinität zur Proteinkinase A innerhalb dieser Serie. Weiterhin werden hier die enthalpischen und entropischen Bindungsbeiträge aufgelistet, welche eine Abschätzung über die Qualität der gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen liefern. Wie bereits in **Kapitel 1.2** der Einleitung beschrieben, ist die Findung von sogenannten „enthalpischen Bindern“ für die Wirkstoffentwicklung von besonderer Relevanz. Da die ITC-Ergebnisse hier nicht absolut gesehen werden sollten (siehe Erläuterung weiter oben zu: Messungen in nur einem Puffersystem), so zeigen sie jedoch innerhalb der Serie eine Tendenz über Binder mit enthalpisch oder entropisch favorisierten Bindungseigenschaften.

Tabelle 5.4: Thermodynamische Bindungsparameter der untersuchten Liganden. Auflistung der enthalpischen (ΔH) und entropischen ($-T\Delta S$) Werte, sowie des Wertes für die freie GIBBSsche Enthalpie (ΔG). Alle Bestimmungen erfolgten mit Ausnahme von **20** in einem HEPES-Puffer.

Verbindung	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]
20 ^[a]	-36.1±0.3	-33.1±0.4	-3.1±0.7
21 ^[b]	-34.8±0.4	-33.5±0.8	-1.3±1.2
27 ^[b]	-	-	-
29 ^[b]	-25.8±0.1	-19.5±0.3	-6.4±0.3
31 ^[b]	-21.3±0.3	-27.8±2.7	6.6±3.0
32	-	-	-
33	-28.0±0.4	-35.3±1.9	7.3±2.3
34	-	-	-
35 ^[c]	-19.9±1.2	-14.0±3.5	-5.8±4.5
36 ^[b]	-29.5±0.9	-22.8±2.1	-6.7±3.0
37 ^[b]	-21.5±0.2	-14.4±0.3	-7.1±0.6
38 ^[c]	-20.3±2.1	-5.2±3.3	-15.1±5.4
39 ^[c]	-18.5±0.7	-9.3±0.7	-9.1±1.2
40	-	-	-

^[a] Werte entnommen aus der Arbeit von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT. Messung erfolgte in einem Phosphat-Puffer.

^[b] Werte entnommen aus meiner Masterarbeit.

^[c] Diese Werte wurden aus Verdrängungsexperimenten erhalten.

Tabelle 5.5: Auswertung der thermodynamischen Bindungsparameter. Die Bindungen zwischen den Liganden und der PKA werden bezüglich der röntgenkristallographischen und thermodynamischen Charakterisierungen bewertet.

Verbindung	K_D [μM]	H- und Salz-Brücken (Protein/Wasser)	Δg [kJ/mol]	spez. EE [kJ/mol]
20	$0.5 \pm 0.1^{[a]}$	4/1 ^[a]	-1.8	-5.5
21	$0.8 \pm 0.1^{[b]}$	4/0 ^[b]	-1.6	-5.6
27	-	3/0	-2.6	-25.8
29	$30.5 \pm 0.1^{[b]}$	1/0 ^[b]	-2.6	-25.8
31	$190 \pm 24^{[b]}$	3/2 ^[b]	-2.1	-4.3
32	-	10/10	-	-
33	12.6 ± 1.8	1/0	-1.8	-7.1
34	-	1/0	-	-
35	$362 \pm 161^{[c]}$	2/0	-1.5	-4.7
36	$7.2 \pm 2.0^{[b]}$	1/1	-2.1	-9.8
37	$172 \pm 20^{[b]}$	2/0 ^[b]	-2.0	-10.8
38	$353 \pm 246^{[c]}$	2/0	-1.8	-1.7
39	$600 \pm 148^{[c]}$	3/0	-1.7	-3.3
40	-	-	-	-

^[a] Werte entnommen aus der Arbeit von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT. Messung erfolgte in einem Phosphat-Puffer.

^[b] Werte entnommen aus meiner Masterarbeit.

^[c] Diese Werte wurden aus Verdrängungsexperimenten erhalten.

Die **Tabelle 5.4** zeigt die thermodynamischen Bindungsparameter der Liganden dieser Serie an der PKA.

Tabelle 5.5 listet darüber hinaus die Anzahl der gebildeten H- und Salzbrücken und verbindet die kristallographischen Befunde mit den Ergebnissen aus den thermodynamischen Messungen. Hierbei ist Δg die Ligandeneffizienz mit:

$$\Delta g = \frac{\Delta G}{N_{nH}} \quad (5.1)$$

In dieser Gleichung steht N_{nH} für die Anzahl an Atomen, die keine Wasserstoffatome sind.

Außerdem ist in selbiger Tabelle der spezifische Effizienzwert (*spez. EE*) aufgelistet, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

$$\text{spez. EE} = \frac{\Delta H}{N_{pA}} \quad (5.2)$$

Hierbei wird die Anzahl an polaren Atomen mit N_{pA} beschrieben. Umso kleiner der spezifische Effizienzwert und die Ligandeneffizienz sind, desto effizienter sind die untersuchten Verbindungen.

20 zeigt innerhalb der Serie die höchste Affinität zu der PKA-Scharnierregion, jedoch nicht den größten enthalpischen Beitrag. Allerdings erfolgte die Messung von Fasudil (**20**), im Gegensatz zu den anderen Messungen, in einem Phosphat-Puffer. Da dieser im Vergleich zu HEPES eine geringere Ionisierungsenthalpie aufweist, kann der tatsächliche enthalpische Beitrag bei einem Protonierungswechsel größer sein. Deshalb wird **20** lediglich bezüglich der vergleichbaren freien GIBBSCHEN Enthalpie bewertet. Das um eine Aminogruppe erweiterte Fasudil-Derivat **21** bindet ähnlich stark ($\Delta\Delta G=1.3$ kJ/mol) an die Scharnierregion der PKA. Die Anzahl der Wechselwirkungspartner bleibt insgesamt in beiden Strukturen gleich, obwohl **21** eine Wasserstoffbrücke mehr zu dem Peptidrückgrat der Scharnierregion ausbildet. Diese H-Brücke ist vermutlich verantwortlich für die leichte Rotation von 10° des Bindemodus, die jedoch nahezu keinen Einfluss auf die Affinität hat.

Einige Fragmente von **20** sind im Vergleich zu diesem allerdings effektiver (siehe spezifischer EE-Wert in **Tabelle 5.5**) bezüglich ihrer Bindung an die PKA. Ein Vergleich der spezifischen Effektivität, welche den Enthalpiegewinn und die Anzahl an Heteroatomen innerhalb eines Liganden berücksichtigt, zeigt **29** als effektivsten Binder. **29** bildet nur eine Wasserstoffbrückenbindung zur Scharnierregion aus und bindet dabei mit einer, für Fragmente sehr hohen Affinität und einem $K_D=30.5$ μM . Weitere, effektivere Binder als **20** stellen die Fragmente **33**, **36** und **37** dar (vergleiche **Tabelle 5.5**), welche jeweils nur eine (**33**) bzw. zwei H-Brücken ausbilden. Aus diesen Ergebnissen wird bereits die Relevanz der Qualität von Wechselwirkungsmustern ersichtlich. Viele Wechselwirkungspartner wie im Fall von **31** sind nicht zwangsläufig von Vorteil bezüglich der Affinität des Liganden zum Zielprotein. Daher weist Adenin

einen vergleichsweise niedrigen spezifischen Effizienzwert auf, welcher lediglich von den Liganden **38** und **39** unterboten wird. Diese Grundgerüste mit vielen Stickstoffen im Ringsystem weisen in dieser Serie zumeist keine gesteigerten Affinitäten auf, da entweder Wechselwirkungen zum Protein ausbleiben, oder diese von einem geringen energetischen Vorteil oder sogar von Nachteil sind. Hierbei muss immer berücksichtigt werden, dass polare Gruppen in Lösung mit Wassermolekülen interagieren und diese Wechselwirkungen für eine Bindung an ein Zielprotein gebrochen werden müssen. Dieser Energieverlust für die aufwändigere Desolvatation muss durch energetisch günstige Wechselwirkungen mit dem Protein wieder ausgeglichen werden. Vor diesem Hintergrund ist die hohe spezifische Effektivität und allgemein die Affinität der Liganden **36** und **37** mit Blick auf die kristallographisch beobachteten Bindungen mit der PKA erklärbar. Aus kristallographischer Sicht überraschend ist die hohe Affinität von **33**, da dieser Ligand lediglich eine H-Brücke zum Protein ausbildet und die Sulfonamidgruppe zunächst nicht zur Affinität beizutragen scheint. Verglichen mit den geladenen Gruppen des Sulfonsäure- und Carbonsäure-Derivats wird jedoch deutlich, dass diese in Lösung zur Stabilisierung der Ladung vermutlich mehr Interaktionen zu Wassermolekülen ausbilden als **33** und sich dadurch energetische Verluste bei der Bindung zur PKA ergeben.

Eine weitere Rolle in der Bindungsaffinität könnte Thr183Oy einnehmen, da es in den Strukturen mit **27**, **31**, **32**, **35**, **36** und **39** zu dem bindenden Fragment orientiert ist und mit diesem direkt oder über ein Wassermolekül vermittelt wechselwirkt.

Allgemein scheint die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu Val123NH den größten enthalpischen Gewinn zu bewirken, sodass diese in jeder Struktur vorliegt. Die zweite Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum nahegelegenen Glu121 Carbonylsauerstoff hingegen ist mit keinem enthalpischen Gewinn verbunden. Dies wird vor allem durch den Vergleich von **29** zu **37**, aber auch von **20** zu **21** deutlich. In beiden Fällen bedeutet das Hinzufügen einer Aminogruppe einen Verlust in der Affinität. Begründet werden könnte dies durch das Auftreten von repulsiven sekundären Wechselwirkungen, welche bei benachbarten Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen werden. Dieser Aspekt wurde bereits durch ZIMMERMAN et al. im Zuge der „Host-Guest-Chemistry“ (deutsch:

Wirt-Gast-Chemie) beschrieben.^[79] Ein weiterer Grund könnte, wie oben bereits erwähnt, das Ablösen der Hydrathülle sein.

5.5 Fazit

Dieses Kapitel stellt eine Fortsetzung vorangegangener Arbeiten dar und erweitert die untersuchte Fragmentserie durch röntgenkristallographische und thermodynamische Betrachtungen der Bindung von Fragmenten an der Proteinkinase A. Kleine chemische Veränderungen an den Fragmenten konnten bereits vorher mit großen Veränderungen bezüglich ihrer Bindungsmotive an der PKA-Scharnierregion in Verbindung gebracht werden. Die auf dem Wirkstoff **20** und dem natürlichen Substrat der PKA beruhende Fragmentserie zeichnet sich durch ihre Fragmentierung und Modifizierung zu den einzelnen Fragmenten aus. So wurde zum Beispiel **20** um eine Aminogruppe zu **21** erweitert, oder **29** als kleinste Verbindung der Serie erhalten. Dieses zeigt dabei besonders überraschend eine vergleichsweise hohe Affinität zur PKA-Scharnierregion, obwohl lediglich ein polares Atom in diesem Fragment enthalten ist. Mit diesem wird eine Wasserstoffbrückenbindung zu Val123NH ausgebildet und sorgt in einer umgekehrten und um 60° rotierten Orientierung, im Vergleich zu **20**, für eine Dissoziationskonstante im zweistellig mikromolaren Bindebereich. **29** ist das Fragment, welches aufgrund seiner geringen Komplexität möglichst ungehindert und mit einer optimal gerichteten Wasserstoffbrückenbindung an die Scharnierregion binden kann. Allgemein ist die Ausbildung einer H-Brücke zu Val123NH als die Wichtigste zu betrachten, da diese in allen röntgenkristallographisch untersuchten Fragment-Strukturen ausgebildet wird.

Weitere in umgekehrter Orientierung bindende Fragmente sind **31** und **35**. Für **35** ist dies überraschend, da sein Sulfonsäurederivat **34** eine zu **20** konservierte Bindung eingeht. In diesen Fällen sind die thermodynamischen nicht mit den kristallographischen Daten korrelierbar und das liegt vermutlich an der Ladung der Carbon- und Sulfonsäuregruppen. Die Aufnahme der thermodynamischen Bindungsparameter mittels ITC war nur bedingt möglich. Weiterhin sollten vor allem für diese beiden Verbindungen pK_a-Unterschiede vorliegen, welche durch die Messung in nur einem Puffersystem nicht ermittelt und somit nicht berücksichtigt werden können. **31** hingegen konnte

mithilfe der ITC untersucht werden und zeigt einen im Vergleich zur Serie hohen enthalpischen Bindungsbeitrag. Allerdings wird die Affinität durch einen entropisch nicht favorisierten Bindungsbeitrag herabgesetzt. Dies könnte durch das Einfangen von zwei Wassermolekülen erklärbar sein, welche infolge fixiert werden und somit zum Verlust ihrer Freiheitsgrade führt (Details siehe Masterarbeit).

Mit Ausnahme von **31** binden alle weiteren, mit einer Aminogruppe in 1-Position dekorierten Verbindungen in einer ähnlichen Orientierung wie **20**. Allerdings weisen diese Verbindungen (**27, 37, 38, 39**) eine Drehung von 20-25° auf. Als Ausnahme muss hier **21** gelten, das lediglich um 10° rotiert vorliegt. In den meisten Fällen wird demnach die Ausbildung einer zweiten H-Brücke zur Scharnierregion bevorzugt, welche jedoch keinen Vorteil auf die Affinität der Verbindungen hat. Im Fall von **40** konnten sogar weder eine Kristallstruktur noch die thermodynamischen Bindungsparameter untersucht werden. Der Grund hierfür liegt sehr wahrscheinlich in der zu geringen Affinität zur PKA, wodurch keine Bindung aus den röntgenkristallographischen Untersuchungen festgestellt werden konnte. Weiterhin sind die Messergebnisse aus den ITC-Messungen nicht auswertbar, da die Titration dieses Liganden nur sehr geringe Wärmesignale während der Messung hervorruft.

Eine Wechselwirkung zu Thr183Oy scheint ebenfalls nicht den gewünschten, enthalpisch günstigen Bindungsbeitrag zu liefern. Keine der zu Thr183Oy wechselwirkenden Verbindungen weist einen Vorteil der Affinität oder des enthalpischen Bindungsbeitrags gegenüber **29** auf, welches lediglich eine H-Brücke zu Val123NH ausbildet. Eine Affinitätserhöhung wird erst durch das Hinzufügen von modifizierten Carbon- oder Sulfonsäuregruppen an der 5-Position des Isochinolingrundgerüsts erreicht. Wie im Fall von **33** oder dem veresterten **36** zeigen diese sowohl einen höheren enthalpischen Bindungsbeitrag, als auch eine höhere Gesamtaffinität im Vergleich zu den in 5-Position unsubstituierten Fragmenten **31, 37, 38, 39** und sogar zu **29**. Die geladenen Varianten **34** und **35** hingegen zeigen in den ITC-Messungen keine hohen Affinitäten und dies hängt vermutlich mit einem hohen Energieaufwand beim Abstreifen der Hydrathülle vor dem Bindungsereignis zusammen. Diese

Hydrathülle ist bei den Verbindungen **34** und **35** vermutlich besonders ausgeprägt, um deren Ladung in Lösung zu stabilisieren.

Zu den thermodynamischen Bestimmungen der Liganden **35**, **38** und **39** ist das geringe Wärmesignal während der ITC-Messungen zu nennen. Die Messungen konnten lediglich durch ein Verdrängungsexperiment mit **21** als starkem Binder durchgeführt werden und führten mit ΔH -Werten zwischen -14.0 bis -5.2 kJ/mol zu den schwächsten enthalpischen, noch messbaren Verbindungen dieser Serie. Problematisch waren diese Messungen jedoch trotz des Verdrängungsexperiments und den hohen Wärmesignalen, da die Zugabe von zu hohen Ligandmengen von **35**, **38** und **39** zu unerklärlichen Messsignalen führte. Diese Signale sind vermutlich auf Schwebeteilchen in der Messzelle und somit entweder auf eine Agglomeration der Liganden untereinander bzw. Interaktionen mit dem Verdrängungsliganden, oder auf eine Denaturierung des Proteins zurückzuführen. Daher wurden vor der Verdrängung Ligandmengen des zu verdrängenden Liganden gewählt, welche eine störungsfreie Messung garantierten. Hierdurch konnte allerdings keine vollständige Absättigung der PKA gewährleistet werden und resultiert in einer geringen Aussagekraft der Messwerte. Es wird jedoch deutlich, dass **35**, **38** und **39** sehr schwache (enthalpische) Binder der PKA sind, auch wenn die thermodynamischen Bestimmungen nahe der Erfassungsgrenze vorgenommen wurden.

Wie hätte demnach die Wirkstoffentwicklung auf Basis dieser, nach dem Fragment-basierten Ansatz, entworfenen Studie ausgesehen? Zunächst wäre vermutlich das **29** als überraschend potentes Fragment aufgefallen, sodass eine Erweiterung auf Grundlage dieses Bindemotivs ausgewählt worden wäre. Somit könnte dieses Fragment in 6-Position anstelle der gewählten 5-Position erweitert werden, da es eine zu **20** umgekehrte Orientierung aufweist. Dadurch würden Folge-Verbindungen vermutlich eine optimal gerichtete Wechselwirkung zu der Scharnierregion ausbilden.

Eine Erweiterung auf Grundlage des natürlichen Substrats **32** wäre wahrscheinlich nicht zielführend, da dieses verglichen mit seinem Baustein Adenin nicht optimal zur Scharnierregion ausgerichtet ist.

Das erscheint für die katalytische Wirkung der PKA sinnig, da ein sehr stark bindendes Substrat nach einmaliger Umsetzung zu einer Produkt-Inhibierung der PKA führen würde.

Hinterlegungsnummern in der PDB-Datenbank

Liganden **ID** – Liganden-Bezeichnung (PDB-Code): **20** – Fasudil (5LCP), **21** – Aminofasudil (6Y2U), **33** – *N,N*-Dimethylisochinolin-5-sulfonamid (6YOT), **34** – 5-Isochinolinsulfonsäure (7AXV), **35** – 5-Isochinolincarbonsäure (7AXT), **36** – 5-Isochinolincarbonsäuremethylester (6Y89), **29** – Isochinolin (6F14), **37** – 1-Aminoisochinolin (7AXW), **38** – 4-Chinazolamin (6Y0B), **27** – 1,7-Naphthyridin-8-amin (6Y2O), **39** – Pyrido[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (6YOU), **40** – Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (Struktur nicht vorhanden), **31** – Adenin (6Y05), **32** – Adenosintriphosphat (6Y8C).

5.6 Experimentelle Durchführung

In diesem Abschnitt werden lediglich die für dieses Kapitel spezifischen experimentellen Durchführungen diskutiert. Die Proteinexpression- und aufreinigung, sowie die Kristallisation der Protein-Ligand-Komplexe und die Aufnahme und Verfeinerung der röntgenkristallographischen Datensätze ist im **Abschnitt 8 (Experimenteller Teil)** beschrieben.

5.6.1 Bestimmung der Rotationswinkel verschiedener Bindeposen

Für einen quantitativen Vergleich der Bindungsmotive der einzelnen Liganden an der PKA wurde die Struktur mit **20** als Referenz verwendet. Mithilfe von Coot^[121] wurden zunächst alle Strukturen mit der des Fasudil-PKA-Komplexes übereinander gelagert. Anschließend wurde jeder Ligand mit der Funktion „rotate/translate molecule“ mit der Isochinolineinheit von **20** zur Deckung gebracht. Hierbei wird in Coot der Winkel der Rotation angezeigt und entspricht der Drehung der jeweiligen Verbindung in Bezug auf die Referenzposition.

5.6.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Bestimmung der thermodynamischen Bindungsparameter von den Liganden **33**, **35**, **38** und **39** an PKA erfolgten mithilfe eines Isothermen Titrationskalorimeter von MALVERN PANALYTICAL (Microcal ITC₂₀₀) in dem in **Tabelle 5.6** aufgeführten ITC-HEPES Puffer. Ebenfalls in dieser Tabelle aufgeführt, ist der für die Messung von **21** verwendete ITC-TRIS Puffer. Die Konzentrationen der Puffer beziehen sich auf 4 L Gesamtvolumen, allerdings wurden diese Substanzen in nur 3.88 L demin. Wasser gelöst, da eine spätere Zugabe von 3% DMSO, zur besseren Löslichkeit der untersuchten Liganden, direkt vor der Messung erfolgte. Dadurch stimmen die angegebenen Konzentrationen mit den tatsächlichen Konzentrationen während der Messung überein.

Tabelle 5.6: Liste der verwendeten Puffer für die ITC-Messungen.

Substanzen	M [g/mol]	c [mM]	m [g]	V _{Puffer} [L]
ITC-HEPES pH 7.4				
HEPES	238.31	30	28.597	4
Magnesiumchlorid Hexahydrat	203.3	10	8.132	4
Natriumchlorid	58.44	100	23.376	4
ITC-TRIS pH 7.4				
TRIS	121.14	30	14.537	4
Magnesiumchlorid Hexahydrat	203.3	10	8.132	4
Natriumchlorid	58.44	100	23.376	4

Für die Vorbereitung des Proteins wurde dieses zunächst in den oben beschriebenen Puffern überführt. Hierzu diente eine Dialyse über Nacht im jeweiligen Puffer, in welchem die Proteinlösung in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO (engl. *molecular weight cut-off*) von 10 kDa gebracht wurde. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels UV/Vis-Messung an einem Nanodrop2000c Spektrometer von THERMO SCIENTIFIC INC. neunfach bestimmt und ein Mittelwert gebildet.

Die Proteinkonzentration für die Messungen von Ligand **21** betrug 63.59 µM. Hierbei wurden 291 µL Proteinlösung mit 9 µL DMSO gemischt und in die Probenzelle der ITC gegeben. Für den Liganden in

der Spritzeneinheit wurde eine Konzentration von 1271.74 μM gewählt. Die Lösung hierfür wurde durch Zugabe von 9 μL DMSO-Ligand-Lösung in 291 μL TRIS-Puffer erhalten. Die Injektionsvolumina betrugen 0.3 μL für die erste Injektion und 1.5 μL für die Weiteren. Während der Messung wurden die Proben- und Referenzzellen auf 25°C gehalten. Eine Durchmischung der Lösung in der Probenzelle erfolgte durch die Injektionsspritze mit 750 Umdrehungen pro Minute. Die Äquilibrierungszeit zwischen zwei Injektionen betrug 150 Sekunden.

Analog zu **21** wurden die Messungen der Liganden **33**, **35**, **38** und **39** durchgeführt. Ein Unterschied zu der Messung von **21** und **33** stellen die Liganden **35**, **38** und **39** dar, da die thermodynamischen Bindungsparameter in einer Verdrängungstitration erhalten wurden. Hierfür wurde das Protein zunächst mit den Liganden **35**, **38** und **39** in einem 15-20-fachen Überschuss bezüglich der Liganden versetzt. Für **33** und **35**, **38** und **39** sind alle zu **21** abweichenden Parameter und Konzentrationen in **Tabelle 5.7** aufgeführt.

Tabelle 5.7: Überblick der verwendeten ITC-Parameter und Konzentrationen. Die neben den Konzentrationen in Klammern angegeben Zahlen beziehen sich auf die Nummer der Messung, welche im Anhang verglichen werden kann. Sofern keine Zahl angegeben ist, wurden alle drei Messungen mit dieser Konzentration durchgeführt.

Ligand	c_{Prot} [μM]	$c_{\text{Lig,verdrängt}}$ [μM]	$c_{\text{Lig,Spritze}}$ [μM]	$V_{\text{Injektion (initial)}}$ [μL]
21	63.59	-	1271.74	1.5 (0.3)
33	119.03	-	2380.60	1.8 (0.3)
35	56.75	1271.74 (1); 851.25 (2,3)	1271.74 (1); 851.25 (2,3)	1.5 (0.3)
38	61.08 (1,2); 56.75 (3)	1221.68 (1,2); 851.25 (3)	1221.68 (1,2); 851.25 (3)	1.5 (0.3)
39	61.08	1221.68	1221.68	1.5 (0.3)

6. Untersuchungen von Folgeverbindungen initialer *in silico* Hits basierend auf einer Naturstoff-Bibliothek

6.1 Einleitende Bemerkungen

Dieses Kapitel basiert auf einem initialen *Docking* einer Fragmentbibliothek und wurde von DR. SERGHEI GLINCA durchgeführt. Die nachfolgenden Experimente und Auswertungen der erhaltenen Daten sind von mir durchgeführt worden.

6.2 Einleitung

Die Entwicklung eines Wirkstoffs an ein Zielprotein startet heutzutage meist mit der Suche nach sogenannten Leitstrukturen, welche im weiteren Verlauf angepasst und optimiert werden. Hierbei können Bibliotheken von chemischen Verbindungen computerbasiert durchsucht werden, wodurch möglicherweise neue Klassen von Inhibitoren gefunden werden.^[122] Beim Aufstellen solcher Bibliotheken steht die Diversität und eine gute Abdeckung des chemischen Raums im Vordergrund. ANALYTICON DISCOVERY ist ein Unternehmen, welches hierfür Fragmente von Naturstoffen als Ausgangssubstanzen wählt.^[122] Diese decken mit anderen Molekülgerüsten den chemischen Raum ab als Liganden, welche auf anderen Substanzklassen basieren. Auf Grundlage dieser Substanzen können die Bibliotheken mit einer etablierten Erweiterungsschemie sehr groß werden.^[123,124] Ein Beispiel ist der Erhalt von 50 Grundgerüsten, welche zu 500 neuen Verbindungen führte.^[124] In einer weiteren Studie konnten vier neue Inhibitorenklassen für unterschiedliche Phosphatasen auf Grundlage von Naturstoffen und biologisch-orientierten Synthesen gefunden werden.^[125]

In dieser Arbeit wurde eine initiale *in silico* Überprüfung zur Findung von neuen Leitstrukturen innerhalb einer von ANALYTICON DISCOVERY aufgestellten Fragmentbibliothek durchgeführt. Die vielversprechendsten Kandidaten, auch *Hits* (deutsch: Treffer) genannt, wurden analysiert und zu neuen Verbindungen erweitert. In dieser aufgestellten Serie weisen die Verbindungen ein molekulares Gewicht von 280-542 g/mol auf und sind, verglichen zu den in vorherigen Kapiteln untersuchten Fragmenten, chemisch recht komplex aufgebaut. Daher stellt die nachfolgende **Tabelle 6.1** eine

Auflistung der Verbindungen zur besseren Übersicht dar. Hierbei werden die IDs von ANALYTICON DISCOVERY neben der in dieser Arbeit verwendeten, fortlaufenden Nummerierung aufgelistet, welche im Anschluss ausschließlich für die Benennung genutzt wird. In **Abschnitt 6.4** werden die Treffer dieser Serie auch mit ihren Strukturformeln dargestellt.

Tabelle 6.1: Zuordnung der ANALYTICON IDs zu der fortlaufenden Nummerierung für die Verbindungen in dieser Arbeit.

ID	ANALYTICON ID	ID	ANALYTICON ID
41	NAT9-312616	52	NAT31-453677
42	NAT11-281526	53	NAT31-455961
43	NAT18-349753	54	NAT31-458109
44	NAT18-356408	55	NAT41-346578
45	NAT22-365191	56	NAT41-515025
46	NAT22-366511	57	NAT41-515049
47	NAT224-574687	58	NAT41-530308
48	NAT231-583979	59	NAT41-530320
49	NAT263-588181	60	NAT41-530327
50	NAT263-588206	61	NAT41-535643
51	NAT274-593692	62	NAT41-535889

6.3 Ergebnisse

An dieser Stelle sei zunächst erwähnt, dass die in diesem Abschnitt verwendeten Begriffe und der theoretische Hintergrund der FRET-basierten Untersuchungen im **Abschnitt 1.5 Fluoreszenz-basierte Aktivitätsmessungen** erläutert sind.

Die FRET-basierte Versuchsreihe wurde im ersten Schritt für eine initiale Treffer-Identifizierung genutzt. Hierbei wurden aus den Vorratslösungen der Liganden, nur die Lösungen der Verdünnungsreihen verwendet, welche die beiden höchsten Ligand-Konzentrationen aufwiesen. Wenn an dieser Stelle kein Herabsetzen der Aktivität und somit keine Inhibition der PKA festgestellt werden konnte, wurde die entsprechende Verbindung nicht weiter für die Vermessung einer gesamten Verdünnungsreihe betrachtet. Eine Inhibition liegt vor, wenn das Emissionsverhältnis von Coumarin zu

Fluorescein signifikant höher als die 0%-Inhibitions-Referenz ist. Aus den initialen Tests wurden die folgenden neun Treffer gefunden: **43, 44, 46, 54, 58-62**. Daraus ergibt sich für diese Ligandenserie eine Trefferquote von 41%.

Bevor die gesamten Verdünnungsreihen der Treffer für eine Analyse verwendet wurden, sollten falsch positive Ergebnisse aufgrund von *Quenching*, Eigenfluoreszenz der Verbindungen oder anderen Effekten ausgeschlossen werden. Hierfür wurden zunächst für jeden Treffer zwei 0%-Inhibitionskontrollen durchgeführt. Das Verhältnis von Coumarin zu Fluorescein liegt unter den verwendeten Bedingungen bei etwa 2 und entspricht keiner Inhibition. Nach Zugabe der Ligandenlösungen in die Kontrollen wurden erneut die Emissionen von Coumarin und Fluorescein ermittelt. Diese Bestimmung ergab eine Abweichung von -1.0% bis 1.7% zu der Messung vor der Liganden-Zugabe. Somit liegt keine signifikante Beeinflussung der Emissionsmessung durch Zugabe der Liganden vor, da diese Abweichungen im Fehlerbereich der Messungen liegen. Das wird ebenfalls dadurch deutlich, dass eine vollständige Inhibition bei einem Verhältnis-Wert von etwa 6 zu erwarten ist und einem prozentualen Unterschied von 300% entspricht. Falsch positive Treffer können daher ausgeschlossen werden.

Die vorausgewählten Liganden wurden im Folgenden genauer untersucht, indem mehrere Messungen der Verdünnungsreihen erfolgten. Da der Versuch lediglich 4%ige DMSO-Vorratslösungen der Liganden in Wasser toleriert und viele davon vor allem in Wasser eine begrenzte Löslichkeit aufweisen, wurde 5 mM als höchste Ligandenkonzentration gewählt. Für die Verbindung **44, 46, 58, 60** und **61** wurde eine maximale Konzentration von 1.25 mM erreicht. Die Konzentrationen beziehen sich hierbei auf ein Volumen von 10 μ L, welches während der Phosphorylierungsreaktion in jeder Titerplattenvertiefung vorlag. Von den Verbindungen **61** und **62** ist, im Gegensatz zu allen weiteren Treffern aus dem Vorversuch, eine zu geringe Inhibierung bei der maximalen Ligandenkonzentration festgestellt worden, sodass kein IC_{50} -Wert ermittelt werden konnte. Für alle weiteren Liganden wurden die in **Abbildung 6.1** gezeigten sigmoidalen Kurvenverläufe erhalten, indem das Verhältnis der gemessenen Coumarin- zu Fluorescein-Emission der einzelnen Titerplattenvertiefungen gegen die Inhibitor- bzw.

Ligandenkonzentration aufgetragen ist. Hierbei repräsentiert eine Vertiefung je eine Ligandenkonzentration der Verdünnungsreihe. Die Verdünnungsreihen wurden zwei Mal in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Testreihen analysiert, sodass insgesamt vier Messwerte für jeden Datenpunkt eines Liganden vorliegen. Eine Ausnahme bildet **58**, für welches insgesamt drei Messwerte vorliegen. Weiterhin wurden für Staurosporin (**30**) nur zwei Messwerte aufgenommen, da dieser Ligand lediglich als Referenzsubstanz für die Durchführbarkeit und Vergleichbarkeit der Messungen auf seine inhibitorische Wirkung bestimmt wurde, jedoch nicht weiter von Interesse ist. Nach den in **Abbildung 6.1** gezeigten Auftragungen sind die Wendepunkte der sigmoidalen Anpassungen der Datenpunkte bestimmt worden, indem der x-Wert, an dem die Steigung maximal ist, als IC_{50} -Wert über die Funktion der Anpassung bestimmt wurde.

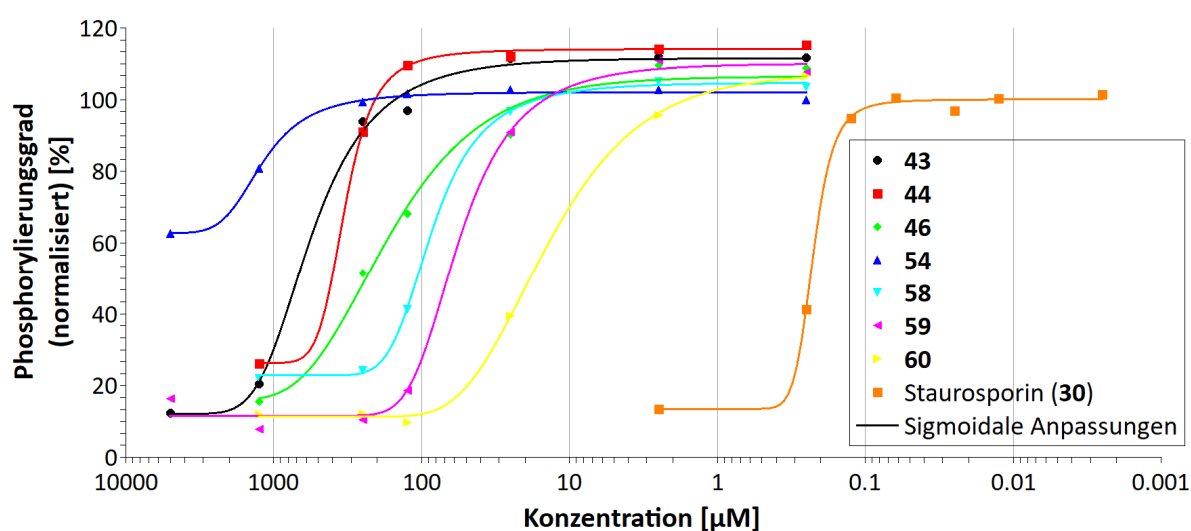


Abbildung 6.1: Auftragung zur Bestimmung der IC_{50} -Werte. Hierbei sind die aus den Messungen berechneten, normalisierten Phosphorylierungsgrade gegen die Konzentrationen der Liganden aufgetragen. Durch die Datenpunkte wurden sigmoidale Anpassungen vorgenommen und aus deren Wendepunkte die IC_{50} -Werte bestimmt.

Mit Ausnahme von **44** (rot) und **54** (blau) konnten zuverlässige IC_{50} -Bestimmungen an den Wendepunkten der sigmoidalen Anpassungen aus **Abbildung 6.1** vorgenommen werden. Der Grund hierfür liegt in der begrenzten Löslichkeit der Verbindungen, sodass keine Datenpunkte bei höherer Ligandenkonzentration als der verwendeten erhalten werden konnten. Somit konnte, wie in der

Abbildung zu sehen ist, kein unteres Plateau (0% Phosphorylierung) und damit keine vollständige Inhibierung der PKA erreicht werden. Die Folge ist eine Verschiebung des Wendepunkts hin zu geringeren Konzentrationswerten, wodurch ein geringerer IC_{50} -Wert bestimmt wird. In den anderen Fällen scheinen die inhibitorischen Wirkungen höher zu sein, sodass bei gleicher maximaler Konzentration bereits eine vollständige Inhibierung und somit ein Erreichen des unteren Plateaus gegeben ist. Die IC_{50} -Werte und weitere Erläuterungen sind im nächsten Abschnitt (**6.4 Auswertung und Diskussion**) gegeben.

K_i -Werte weisen im Gegensatz zu IC_{50} -Werten eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Experimenten auf, da in diesen die Proteinkonzentration berücksichtigt wird. Mithilfe dieser und der Kenntnis der IC_{50} -Werte, lassen sich die K_i -Werte nach **Gleichung 1.8** bestimmen. In dieser Gleichung findet auch die Konzentration an ATP und die MICHAELIS-MENTEN-Konstante für diese Reaktion Berücksichtigung, sodass hierfür noch eine Bestimmung dieser Konstante notwendig ist und durch das folgende Experiment bestimmt wurde.

Für ATP wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Reaktion ohne Inhibitoren durchgeführt. Die inversen Werte der erreichten Umsatzgeschwindigkeiten wurden in **Abbildung 6.2** in einem LINEWEAVER-BURK-Diagramm gegen die inverse ATP-Konzentration aufgetragen. Die Ergebnisse stammen hierbei aus einer Vierfach-Bestimmung.

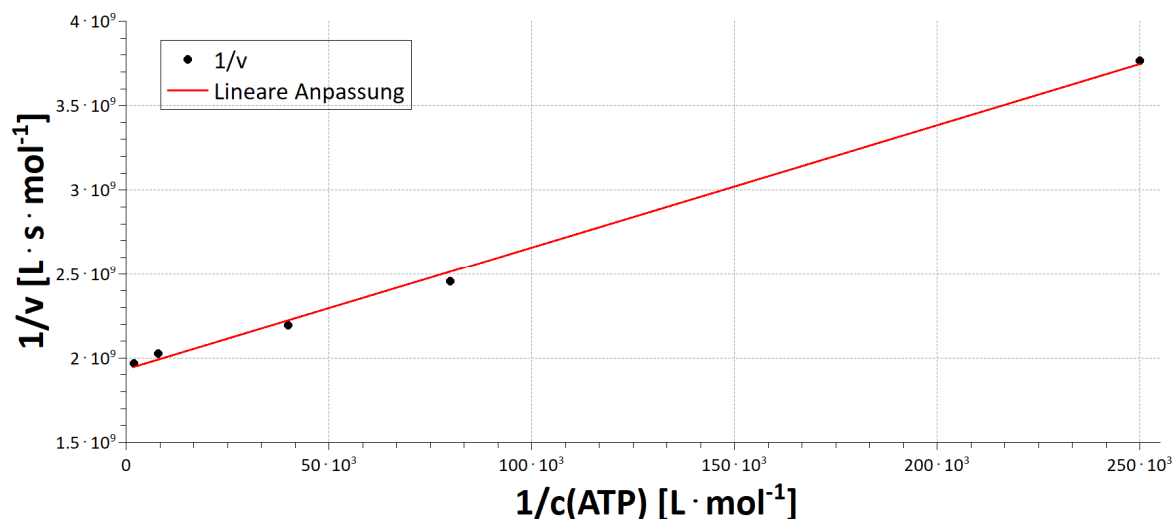


Abbildung 6.2: LINEWEAVER-BURK-Auftragung zur Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante. Hierbei wird die inverse Umsatzgeschwindigkeit gegen die inverse ATP-Konzentration aufgetragen.

Aus der LINEWEAVER-BURK-Auftragung wird die inverse negative MICHAELIS-MENTEN-Konstante am Schnittpunkt der linearen Anpassung mit der x-Achse erhalten. Dadurch ergibt sich für diese Reaktion ein K_m von $3.8 \mu\text{mol/L}$. Nach dem Einsetzen der gesammelten Werte in **Gleichung 1.8** ergeben sich die im nächsten Abschnitt aufgeführten K_I -Werte.

6.4 Auswertung und Diskussion

Die im Ergebnisteil beschriebenen Treffer dieser Serie sind in **Tabelle 6.2** mit ihren Strukturformeln und den ermittelten IC_{50} -, sowie K_I -Werten aufgelistet. Hier sind die Liganden absteigend nach ihrer inhibitorischen Wirkung aufgelistet. In dieser Serie konnten Liganden mit K_I -Werten im Bereich von 10^{-6} - 10^{-4} M bezüglich der inhibitorischen Wirkung auf die Proteinkinase A beobachtet werden.

Tabelle 6.2: Auflistung der Liganden mit Strukturformeln und den ermittelten IC_{50} - und K_i -Werten.
Die Liganden sind absteigend nach ihrer inhibitorischen Wirkung aufgelistet.

Ligand ID	Strukturformel	IC_{50} [μ M]	K_i [μ M]
60		13.2	6.4
59		45.6	22.1
58		76.6	37.2
46		160 (grafisch, durch Ablesen bestimmt)	77.6
44		324.9	157.6
43		407.2	197.6
54		1103.5	535.4
47		-	-
61		-	-
62		-	-

Die besten Treffer sind in der Reihenfolge **60**, **59**, **58** und unterscheiden sich lediglich bezüglich des Substituenten am endocyclischen Stickstoff des Morpholinrings. An diesem liegt im Fall von **59** und **60** ein Benzylgruppe vor, die sich nur durch einen Fluor(**60**)- bzw. Hydroxy(**59**)-Substituenten in *ortho*-Position unterscheidet. **58** ist an dieser Stelle mit einem *N*-Acetylpiperidin dekoriert.

Die nächsten drei Treffer in der Reihe sind **46**, **44** und **43**. Sie tragen ein Oxadiazol als gemeinsames Motiv, welches jedoch sehr unterschiedliche Substituenten vor allem in der in 5-Position befindlichen Erweiterungsrichtung trägt. In 3-Position weisen die Erweiterungen, bestehend aus einem aromatischen Sechsring, eine höhere Ähnlichkeit auf.

Die Liganden **54** und **61** bzw. **62** zeigen in dieser Reihenfolge die schwächsten inhibitorischen Wirkungen der aus dieser Ligandenserie bestimmten Treffer. Hierbei konnte lediglich für **54** eine Bestimmung des K_i -Wertes erfolgen, weshalb **61** und **62** nicht weiter betrachten werden sollen. Bei **54** ist wie bei **46** ein Pyridin enthalten, welches allerdings abweichend über eine Methyleinheit mit dem nächsten Motiv erweitert ist. Die Erweiterung ist ein Pyrrolidin und kommt bereits in **44** vor. Allerdings sind die weiteren Motive nicht in den anderen Treffern wiederzufinden und weisen somit die größte Abweichung auf. Für **47** konnte keine inhibitorische Wirkung auf die PKA festgestellt werden.

Neben den oben beschriebenen Versuchsreihen wurden auch kristallographische Ansätze zur Untersuchung der Protein-Ligand-Komplexbildung herangezogen. Zunächst wurde versucht, die Liganden in vorgefertigte Apokristalle mithilfe der *Soaking*-Methode in einen Protein-Ligand-Komplex zu bringen. Aus diesen Versuchen konnten jedoch keine Treffer gefunden werden. Das könnte mit der Größe der Liganden zusammenhängen, die es den Liganden nicht erlaubt, durch die räumlich begrenzten Lösungsmittelkanäle in die aktive Tasche der PKA zu diffundieren. Daher sollte von diesem Zeitpunkt an die Protein-Ligand-Komplexbildung nach der Kokristallisations-Methode realisiert werden. Der Vorteil besteht darin, dass die Komplexe in Lösung gebildet werden. Damit wird die Diffusion der Liganden räumlich nicht eingeschränkt, da das Protein in Lösung flexibler ist. Darüber

hinaus sind bei Proteinen in Lösung keine Lösungsmittelkanäle im Vergleich zu einem relativ festen Kristallverbund vorhanden, sodass auch hier keine räumliche Begrenzung entsteht.

Im Zuge dieser Arbeit sind die Kokristallisationen aller Liganden angesetzt worden, von denen bei den Liganden **42-44**, **46**, **47**, **56** und **61** eine erfolgreiche Kristallisation beobachtet wurde. Von diesen wurden bisher die Kristalle mit den Liganden **43**, **46** und **47** erfolgreich an einer Synchrotroneinrichtung vermessen und die entsprechenden Datensätze analysiert. Allerdings konnte nur im Fall von **46** ein Ligand in der Elektronendichte gefunden werden. Dies ist besonders vor dem Hintergrund überraschend, dass für die verschiedenen Ansätze auch optisch unterschiedliche Kristalle erhalten wurden. In **Abbildung 6.3** sind die erhaltenen Kristalle gezeigt und dem jeweiligen Kristallisationsansatz zugeordnet.

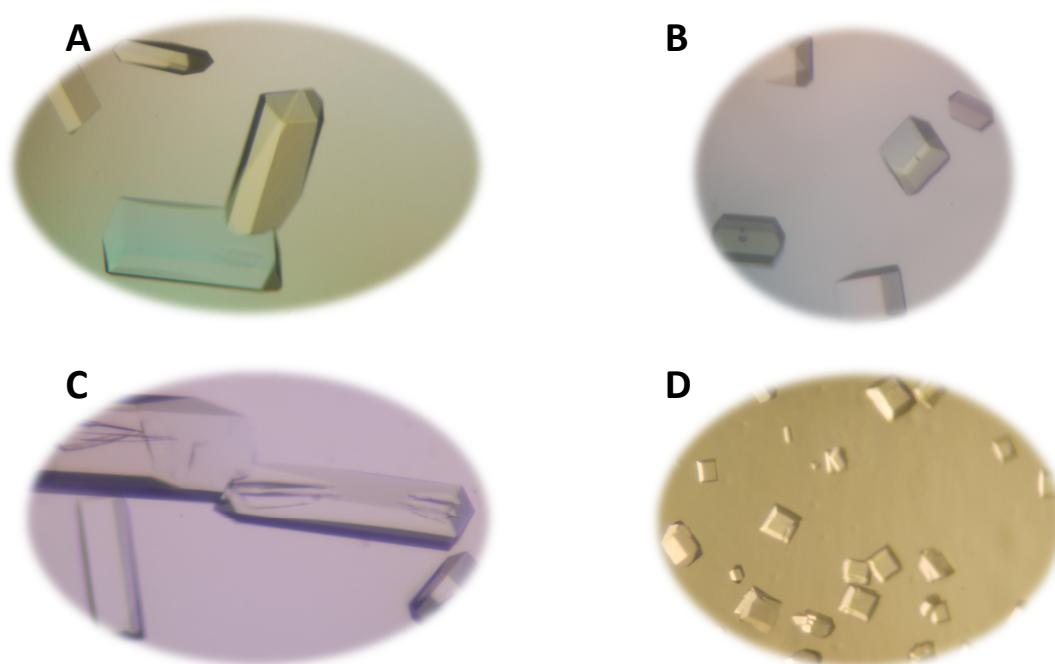


Abbildung 6.3: Bilder der erhaltenen Kristallformen. Kokristallisation der PKA mit (A) **43**, (B) **44**, (C) **47**, (D) **61** und PKI.

Ein Ausbleiben der Ligandenbindungen in den beiden Fällen mit **43** und **47** ist aufgrund des Erhalts der Proteinkristalle überraschend. Eine Erklärung könnte möglicherweise die leicht veränderten Kristallisationsbedingungen durch Zugabe der unterschiedlichen Liganden sein, was allerdings unwahrscheinlich erscheint. Da die Zellparameter in einem, verglichen mit Strukturen aus vorherigen Projekten, ähnlichem Bereich vorliegen und außerdem in allen Fällen die Raumgruppe $P2_12_12_1$ erhalten wird, können größere Liganden-induzierte Änderungen ausgeschlossen werden. Deshalb ist eine Bindung der Liganden z.B. zwischen den Grenzflächen der Proteineinheiten unwahrscheinlich, zumal hierfür keine Elektronendichte beobachtet wurde. Weiterhin wurden an diesen Grenzflächen keine sehr großen Verschiebungen der Proteinhauptkette gefunden, welche auf eine Bindung eines Liganden in diesem Bereich hindeuten könnte. Ein Vergleich mit der Struktur des kristallographischen Treffers **46** zeigt ebenfalls keine großen Abweichungen der insgesamt drei erhaltenen Strukturen.

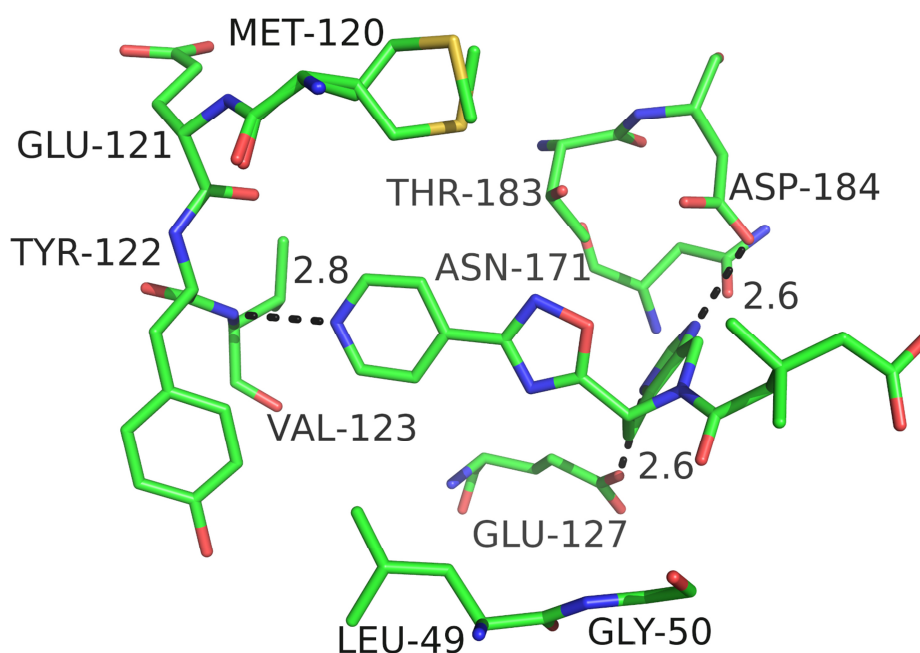


Abbildung 6.4: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 46 (1/2). Der Ligand **46** bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen zu Val123NH (2.8 Å), Glu127Oε (2.6 Å) und Asp184Oδ (2.6 Å). In dieser und der nachfolgenden Abbildung sind die Heteroatome entsprechend des Typs kodiert (C: unterschiedlich für die einzelnen Komplexe, N: blau, O: rot, S: gelb). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien mit den Abständen in Å dargestellt. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Ein Ausschnitt der Struktur mit **46** ist in **Abbildung 6.4** und **Abbildung 6.5** gezeigt. Der Ligand steht über drei Wasserstoffbrückenbindungen in Wechselwirkung mit dem Protein. Als Interaktionspartner nutzt der Ligand den Stickstoff des Pyridinrings als Protonenakzeptor um mit Val123NH (2.8 Å) zu wechselwirken. Das Glu127O ϵ (2.6 Å) wird von einem Stickstoff des Imidazolrings adressiert. Die dritte Wasserstoffbrückenbindung besteht zwischen dem zweiten Stickstoff des Imidazolrings und Asp184O δ (2.6 Å). Eine Analyse mit dem PISA-Server zeigt eine Vergrabenheit des Liganden von 79.4% und ist damit deutlich lösungsmittelixponierter als die kleineren Liganden und Fragmente aus **Kapitel 5**. Auffällig ist außerdem, dass der Ligand nahezu keine Wechselwirkungen zu Wassermolekülen eingeht, wenngleich fünf Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind (Abstand < 5 Å, nicht in der Abbildung gezeigt). Lediglich ein Wassermolekül liegt mit 3.4 Å Abstand relativ nah an einem der beiden Stickstoffe des Imidazolrings und könnte als eine schwache Wasserstoffbrückenbindung interpretiert werden (vergleiche **Abbildung 6.5**).

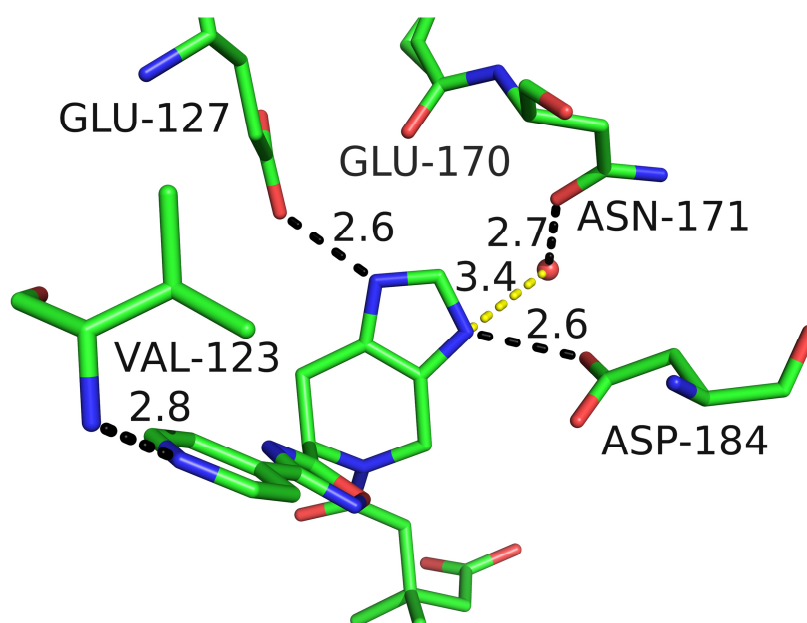


Abbildung 6.5: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 46 (2/2). Hier sind die Wechselwirkungen zwischen **46** und den Aminosäuren Glu127 und Asp184 näher dargestellt. Die gelb markierte gestrichelte Linie zeigt eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül (3.4 Å) an.

6.5 Fazit

In diesem Projekt wurde eine Serie von Folgeverbindungen basierend auf einer *in silico* Auswahl von Fragmenten untersucht. Die Fragmente stammen aus einer Naturstoffbibliothek von ANALYTICON DISCOVERY. Aus den 22 Folgeverbindungen konnten in einer FRET-basierten Versuchsreihe bei neun Verbindungen eine inhibitorische Wirkung auf die Proteinkinase A nachgewiesen werden, was einer Trefferquote von 41% entspricht. Zwei dieser Verbindungen konnten nicht auf ihren K_i -Wert untersucht werden, da die höchste zu erreichende Ligandenkonzentration für **61** und **62** keine vollständige Inhibierung der PKA zur Folge hatte. Wenn diese nicht als Treffer angesehen werden, ergibt sich eine Trefferquote von 31%.

Auffällig ist vor allem ein Motiv, welches in den drei Treffern mit den höchsten inhibitorischen Wirkungen auftritt. Dieses setzt sich aus je einem Morpholin-, Imidazol- und Chlorthiophen-Ring zusammen, die miteinander verknüpft sind und in den Verbindungen **58-60** auftreten. Der beste Treffer dieser Serie ist **60** und bindet mit einem $K_i=6.4 \mu\text{M}$ an die PKA. Alle weiteren Treffer weisen K_i -Werte im zwei- oder dreistellig mikromolaren Bereich auf. Der höchste K_i -Wert konnte für **54** festgestellt werden und liegt bei $535.4 \mu\text{M}$.

Überraschend sind die Ergebnisse aus den Kokristallisationsversuchen. Aufgrund der gemessenen K_i -Werte sollte die, für jede Verbindung eingesetzte Menge (10 mM im Kristallisationsansatz) ausreichen, um eine vollständige Besetzung des aktiven Zentrums zu erreichen. Allerdings konnte bisher lediglich ein kristallographischer Treffer beobachtet werden, wenngleich unterschiedliche Kristalle aus den Ansätzen erhalten wurden. Daher bleibt die Frage der Ligand-Bindemotive mit Ausnahme von **46** offen und muss in Zukunft weiterverfolgt werden.

Es wurden alle 22 Verbindungen in je einem Kokristallisationsansatz versucht zur Kristallisation mit der PKA zu bringen. Für sieben Ansätze konnten Kristalle erhalten werden, von welchen lediglich drei erfolgreich an einer Synchrotroneinrichtung vermessen wurden. Nur in einem Fall (**46**) konnte ein

Ligand in die Elektronendichte eingepasst werden. Sobald weitere Ergebnisse vorliegen, können die besten und vielversprechendsten Motive ausgesucht und zur weiteren Entwicklung verwendet werden. Da diese Serie auf Naturstoff-Fragmenten basiert, könnten neue Leitstruktur-Motive für die Entwicklung von Kinase-Wirkstoffen gefunden werden. Diese würden Alternativen zu den bisherigen Leitstrukturen darstellen.

6.6 Experimentelle Durchführung

Der folgende Abschnitt beinhaltet die Durchführung der FRET-Versuchsreihe, welche auf dem Versuchsprotokoll^[35] des *Assay-Kit*-Vertreibers basiert. Für den kristallographischen Teil gibt es in **Kapitel 8** einen eigenen Abschnitt, in welchem alle kristallographischen Versuche dieser Arbeit beschrieben werden.

Für die Probenvorbereitung wurden die zu untersuchenden Verbindungen in DMSO gelöst und Konzentrationen von 0.1-1 M erreicht. Aus diesen Lösungen wurden 4 µL entnommen und 96 µL dest. H₂O hinzugefügt. Im Folgenden wurde eine Verdünnungsreihe mit einer DMSO-Lösung (4% in H₂O) hergestellt, in welcher die Ligandenkonzentrationen 20, 5 und 1 mM, sowie 500, 100, 10 und 1 µM enthalten waren. Für Staurosporin wurde eine zweite Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 500, 250, 100, 50, 10, 1 und 0.1 nM hergestellt.

In eine schwarze 384er Titerplatte von GREINER BIO-ONE für Mikroliter-Volumina wurden für die Testreihe zunächst 2.5 µL der einzelnen Verdünnungen in eine Titerplattenvertiefung pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 5 µL des Kinase/Peptid-Mixes. Dieser bestand zu gleichen Teilen aus einer Proteinlösung (PKA 50 ng/mL) und einer Lösung des zu phosphorylierenden Peptids (Z'LYTE™ Ser/Thr 1 Phospho-Peptid, 8 µM). Beide Lösungen wurden mit einem 1.33-fachen Kinase-Puffer hergestellt, welcher aus 250 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM Magnesiumchlorid, 5 mM EGTA und 0.05% BRIJ-35 bestand. Die Werte sind hierbei auf den einfachen Kinase-Puffer bezogen. Der 1.33-fache Kinase-Puffer wurde ebenfalls in jede Titerplattenvertiefung pipettiert (2.5 µL).

Für die Kontrollmessungen, wurden je drei Mal drei Titerplattenvertiefungen benötigt. Die erste Spalte ist die 100%-Inhibitionskontrolle, in welche je 2.5 µL DMSO (4% in H₂O), 5 µL Kinase/Peptid-Mix und 2.5 µL 1.33-facher Kinase-Puffer pipettiert wurden. In der zweiten Spalte wurden 2.5 µL DMSO (4% in H₂O) und 5 µL Kinase/Peptid-Mix für die 0%-Inhibitionskontrolle pipettiert. Die 100%-Phosphorylierungskontrolle befand sich in der dritten Spalte und enthielt 2.5 µL DMSO (4% in H₂O), 5 µL Phospho-Peptid-Lösung (Z'-LYTE™ Ser/Thr 1 Phospho-Peptid, 8 µM in 1.33-fachen Kinase Puffer) und 2.5 µL 1.33-facher Kinase-Puffer.

Zum Start der Phosphorylierung wurden allen Titerplattenvertiefungen, mit Ausnahme der 100%-Phosphorylierungskontrolle, 2.5 µL einer 16 µM ATP-Lösung (in 1.33-fachen Kinase-Puffer) hinzugefügt. Nach einer Zeit von 1h bei Raumtemperatur wurde der nächste Reaktionsschritt gestartet.

In diesem Reaktionsschritt erfolgt eine Spaltung des nicht-phosphorylierten Peptids. Hierzu wurden 5 µL einer sogenannten Entwicklungs-Lösung in alle Vertiefungen hinzugefügt. Die Lösung bestand aus dem Entwicklungsreagenz A und einem Entwicklungspuffer, welcher in dem vorgefertigten *Kit* enthalten war. Die genaue Herstellungsprozedur wurde gemäß des Analysenzertifikats auf der Internetseite des Vertreibers durchgeführt und ist für jede Charge leicht abweichend.

Nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur wurden 5 µL einer vorgefertigten Stopp-Lösung in jede Titerplattenvertiefung gegeben, wodurch die Spaltung unterbrochen wurde.

Anschließend erfolgten Fluoreszenz-basierte Messungen an einem TECAN SAFIRE II *Microplate-Reader*. Für jedes *Well* wurde zunächst die Emissionsintensität für Coumarin bei 445 nm und daraufhin die Emission für Fluorescein bei 520 nm gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug für beide Messungen 400 nm. Weitere Einstellungen: Anzahl der Messungen: 10, Bandbreite der Anregungs- und Emissionswellenlängen: 10 nm, Modus: hohe Sensitivität, Integrationszeit: 2000 µs, Z-Position: 12300 µm, Temperatur: Raumtemperatur.

Für die ATP-Verdünnungsreihe wurden die Konzentrationen 2 mM, sowie 500, 100, 50, 16, 1 und 0.1 μ M gewählt. Hiervon wurden 2.5 μ L in die Titerplattenvertiefungen zusammen mit 2.5 μ L DMSO (4% in H₂O) gegeben. Zum Start der Phosphorylierungsreaktion wurden in diesem Fall 5 μ L des Kinase/Peptid-Mixes (Details siehe oben) hinzugegeben. Das weitere Vorgehen für diese Testreihe ist identisch mit der oben beschriebenen Vorgehensweise für die Messungen der zu untersuchenden Verbindungen.

7. Strukturbasiertes Wirkstoffdesign mit Phenol als Sonde

7.1 Einleitende Bemerkung

Diesem Kapitel liegen Ergebnisse aus der Doktorarbeit von DR. HELENE KÖSTER^[126] und zwei unveröffentlichte Strukturen von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT zugrunde. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden abschließende Untersuchungen an den letzten Verbindungen der Serie durchgeführt, welche sich vor allem mit der Stereochemie der Liganden beschäftigen. Die Liganden der Serie wurden von DR. SASCHA BRASS und HANS-DIETER GERBER synthetisiert. Mein Eigenanteil ist die röntgenkristallographische Aufnahme und Analyse von fünf Protein-Ligand-Komplexen (**67k**, **67s**, **68k**, **68s**, **72s**). Außerdem habe ich in einer FRET-basierten Versuchsreihe die inhibitorischen Wirkungen der Verbindungen **66-69** auf die CHO PKA untersucht.

7.2 Einleitung

Für das strukturbasierten Wirkstoffdesign können neben den initialen HTS-Verfahren der pharmazeutischen Industrie, in denen meist größere Verbindungen gefunden werden, auch andere Konzepte angewendet werden. So wurde für dieses Projekt in der Doktorarbeit von DR. HELENE KÖSTER eine Sonde erweitert, die mithilfe des *De-Novo-Design*-Konzepts gefunden wurde.^[127] Ausgehend von Phenol als Sondenmolekül wurde eine Testbibliothek durchmustert, die 4000 käuflich erhältliche Fragmente enthielt und schließlich zu fünf Phenolderivaten führte. Davon konnte 2-Methyl-4-Acetylphenol (**63**) in einer Kristallstruktur mit der humanen PKA untersucht werden. Im nächsten Schritt wurde diese Leitstruktur mithilfe von *in silico* Methoden gestützt erweitert, indem ein Interaktionspartner zu Lys72 und eine hydrophobe Gruppe nahe der Glycin-reichen Schleife eingeführt wurden. Für Ersteren sollte ein Carbonylsauerstoff dienen, der über ein Hydrazin mit der Leitstruktur verbunden ist. Als hydrophobe Gruppe wurde zunächst ein Methoxybenzol eingesetzt. Dies führte zu Verbindung **64** und weiteren Derivaten (vgl. **Abbildung 7.1**). In SPR-Messungen wurde eine Affinität von 70 μM an der humanen PKA beobachtet. In zusätzlichen Optimierungsschritten und unter Betrachtung der Affinitätsdaten konnten weitere Verbesserungen durch unterschiedliche Dekorationen erreicht werden. So wurde zum Beispiel bei Verbindung **65** eine Affinität von 3.4 μM erreicht, indem eine Aminogruppe zwischen der Carbonylgruppe und dem Benzolring als

α -Aminosäure eingeführt wurde. Weitere wichtige Anpassungen waren die Einführung eines Bromatoms am Phenolring, sowie eines Chloratoms am Benzolring, wodurch das Phe54 mit einer Halogen- π -Wechselwirkung adressiert werden sollte. Schließlich konnten Affinitäten zur humanen PKA im nanomolaren Bereich (bis zu $K_D=110$ nM) gemessen werden.

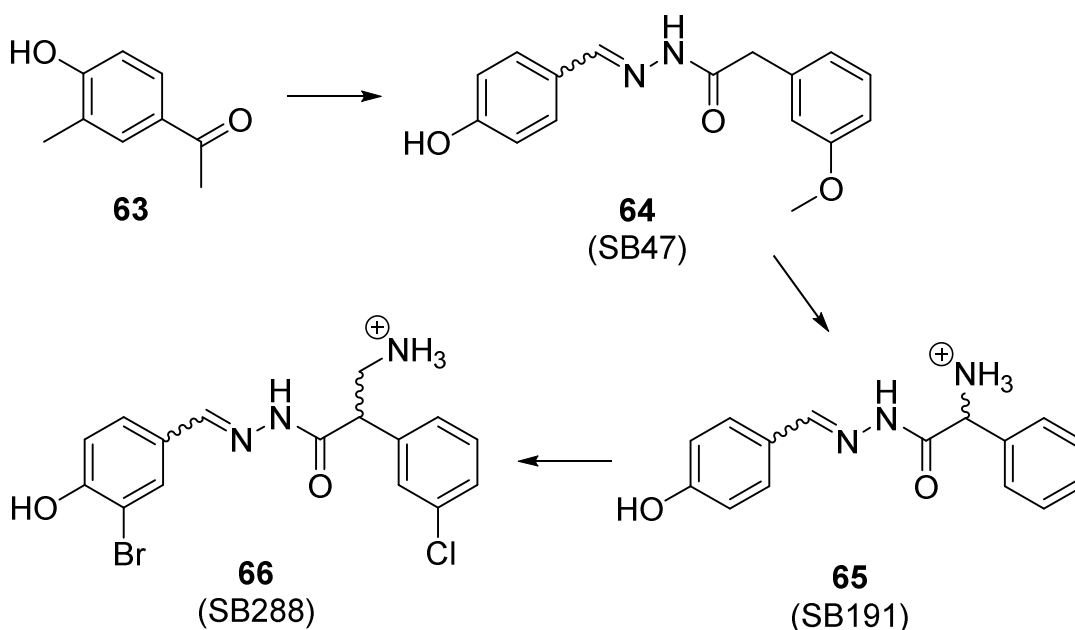


Abbildung 7.1: Darstellungen einiger Verbindungen dieser Serie. Dargestellt sind die Strukturformeln ausgewählter Vertreter dieses Projekts zur Entwicklung eines Wirkstoffs ausgehend von Phenol als Sonde. Über Phenol, welches hier nicht dargestellt ist, wurde die Leitstruktur **63** erhalten. Durch Erweiterungen konnte **64** mit einer moderaten Affinität zur humanen PKA erhalten werden. Die Einführung einer Aminogruppe und weitere Anpassungen führten zu **65** und schließlich zu **66**, welches eine sehr gute Affinität im nanomolaren Bereich zur humanen PKA aufweist.

Die Einführung der Aminogruppe spielt eine sehr wichtige Rolle, da diese zum einen die Affinität signifikant erhöht und zum anderen ein Stereozentrum erzeugt. Dadurch liegen die Liganden, mit Ausnahme der in dieser Arbeit nicht betrachteten α -Aminosäure-Derivate, als racemische Verbindungen vor. Zusätzlich weisen die Liganden noch eine *E/Z*-Isomerie am zur Hydrazingruppe benachbarten Kohlenstoffatom auf. Dadurch ist eine Abschätzung der Affinität einzelner Verbindungen (enantiomerenrein) zur PKA schwer vorherzusagen. Im optimalen Fall wäre eine Verbindung vierfach affiner, wenn die restlichen Isomere keine Affinität zur PKA aufweisen würden. Eine nähere

Betrachtung dieses Problems soll in dieser Arbeit vorgenommen werden. Hierfür wurden vor allem die Verbindungen **67** und **68** (β -Aminosäuren, siehe **Abbildung 7.2**), sowie deren Ethylamino-Derivate (γ -Aminosäuren) betrachtet, da sie in den SPR-Messungen nur sehr geringe Affinitätsunterschiede zeigen. Es stellen sich die folgenden Fragen: Welche Verbindung ist die affinste? Wie sieht die dazugehörige Stereochemie aus? Und lässt sich die Affinität mit der Röntgenkristallographie erklären? Diese Fragen sollen in den nächsten Abschnitten geklärt werden. Hierbei sei angemerkt, dass meine Untersuchungen an der CHO PKA durchgeführt wurden und somit eine geringe Abweichung zu den vorangegangenen Versuchen mit der humanen PKA darstellt.

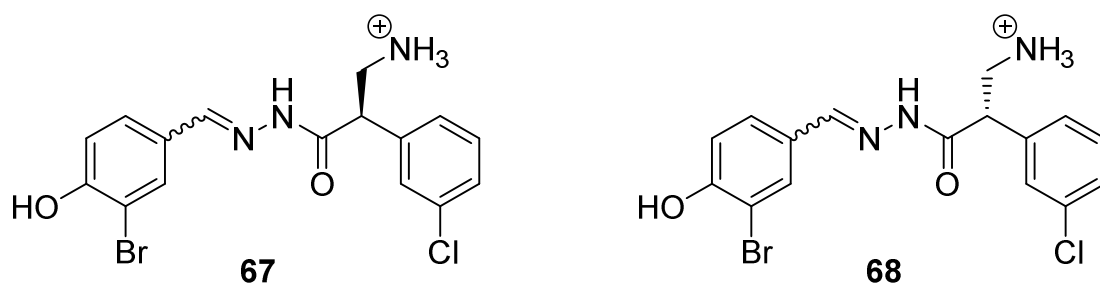


Abbildung 7.2: Strukturformeln der stereoselektiv hergestellten Verbindungen **67** und **68**. Die Verbindung **67** ist *R*-konfiguriert und **68** weist eine *S*-Konfiguration auf.

In **Tabelle 7.1** sind die im Folgenden untersuchten Liganden zur Übersicht erläutert und einer ID zugeordnet.

Tabelle 7.1: Auflistung der untersuchten Verbindungen und Zuordnung mittels ID. Die Verbindungs-ID bezieht sich auf die Nummer des Liganden und die Struktur-ID gibt Auskunft über die Methode, nach der die jeweilige Komplexstruktur mit der PKA erhalten wurde. Die Strukturformeln für **67** und **68** sind in **Abbildung 7.2** aufgeführt.

Verbindungs-ID	Beschreibung	Struktur-ID	Methode
66	Racemisches Gemisch von 67 und 68	66k	Kokristallisation
67	<i>R</i> -konfigurierte β -Aminosäure	67k 67s	Kokristallisation <i>Soaking</i>
68	<i>S</i> -konfigurierte β -Aminosäure	68k 68s	Kokristallisation <i>Soaking</i>
69	γ -Aminosäure von 66 , racemisches Gemisch	69k	Kokristallisation
70	66 ohne Chlor-Substituent	70k	Kokristallisation
71	69 ohne Chlor-Substituent	71k	Kokristallisation
66+69	1:1-Gemisch von 66 und 69	72s	<i>Soaking</i>

7.3 Ergebnisse

Die untersuchten Verbindungen unterscheiden sich bezüglich ihrer Stereochemie und der Art der Aminosäure (β -/ γ -Aminosäure). Für den Diskussionsteil werden darüber hinaus Strukturen betrachtet, welche keinen Chlorsubstituenten aufweisen (vgl. **Tabelle 7.1**). Zunächst konnten die Kristallstrukturen von **67s** und **68s** in einem *Soaking*-Experiment erhalten werden (**Abbildung 7.3** und **Abbildung 7.4**).

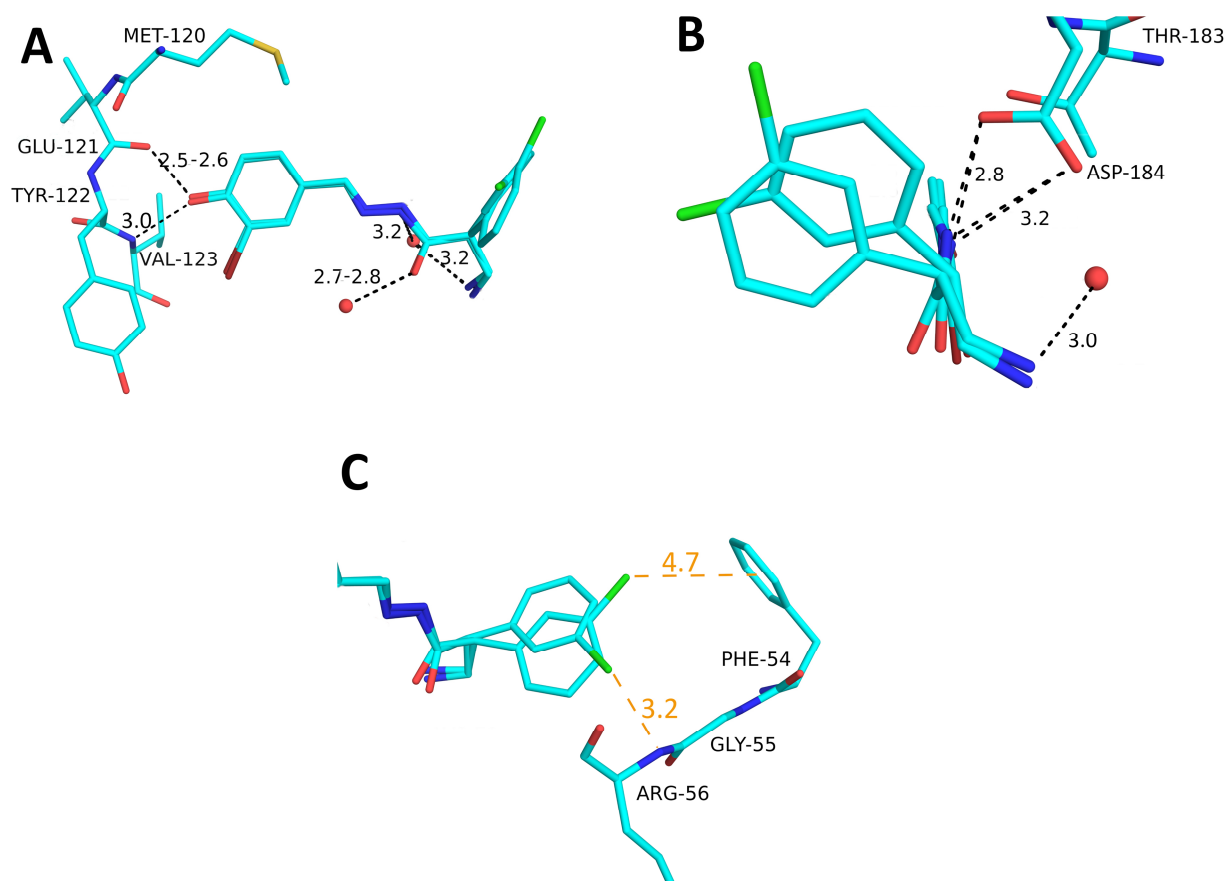


Abbildung 7.3: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 67s. In dieser Struktur wurde der Ligand **68** in die Elektronendichte eingepasst. (A) Die Scharnierregion wird von der Hydroxygruppe adressiert. (B) Asp184 steht in Wechselwirkung mit der Hydrazinfunktion des Liganden. Weiterhin besteht eine H-Brücke von der Aminogruppe zu einem Wassermolekül. (C) Der Chlorsubstituent steht in Halogenwechselwirkungen mit Phe54 und Arg56N. Die Elektronendichte für den Liganden ist in **Abbildung 9.4** gezeigt. Hier und in den folgenden Bildern sind die Heteroatome dem Typ entsprechend kodiert (N: blau, O: rot, F: türkis, S: gelb, Cl: grün, Br: dunkelrot, Wassermoleküle: rote Kugeln, H-Brücken: schwarz gestrichelte Linien mit Abständen in Å, Halogenwechselwirkungen: orange gestrichelte Linien mit Abständen in Å. Kohlenstoffatome sind für die verschiedenen Komplexe unterschiedlich gefärbt).

Überraschenderweise konnte nach beiden *Soaking*-Ansätzen **67s** und **68s** lediglich der S-konfigurierte Ligand **68** in die Elektronendichten eingepasst werden. In beiden Strukturen (**Abbildung 7.3 A** und **Abbildung 7.4 A**) bindet dieser in der gleichen Weisen an den Rückgrat-Carbonylsauerstoff von Glu121 (2.5-2.6 Å) und Val123NH (3.0-3.1 Å). Außerdem ist die Orientierung der Chlorbenzoleinheit gleich und steht mit dem Chlorsubstituenten in Wechselwirkung mit Arg56N (3.1-3.2 Å, vgl. **Abbildung 7.3 C** und **Abbildung 7.4 C**). In einer alternativen Konformation, welche zu 53% (**67s**) und 40% (**68s**) vorliegt, ist

das Chloratom zu der Seitenkette von Phe54 gerichtet (4.7 und 4.8 Å) und bildet eine Halogen- π -Wechselwirkung aus. Weiterhin geht in beiden Strukturen ein Stickstoffatom der Hydrazinfunktion Wechselwirkungen zu einem Wassermolekül (3.2 Å) und Asp184 (2.8-3.2 Å) ein (**Abbildung 7.3 B** und **Abbildung 7.4 B**). Der Carbonylsauerstoff von **68** bildet in beiden Fällen eine H-Brückenbindung zu einem Wassermolekül aus (2.7-2.9 Å). Ein geringer Unterschied tritt in den beiden Strukturen bezüglich der Wechselwirkungen an der Aminogruppe auf. Bei **68s** weist der Ligand **68** eine H-Brücke zu Glu170 (2.6-2.7 Å) und einem Wassermolekül (3.0 Å) auf (**Abbildung 7.4 B**). Für **67s** wird für selbigen Liganden lediglich eine H-Brücke zu einem Wassermolekül (3.0 Å) ausgebildet (**Abbildung 7.3 B**). Die Seitenkette von Glu170 ist in dieser Struktur zu einer dem Liganden abgewandten Position gerichtet.

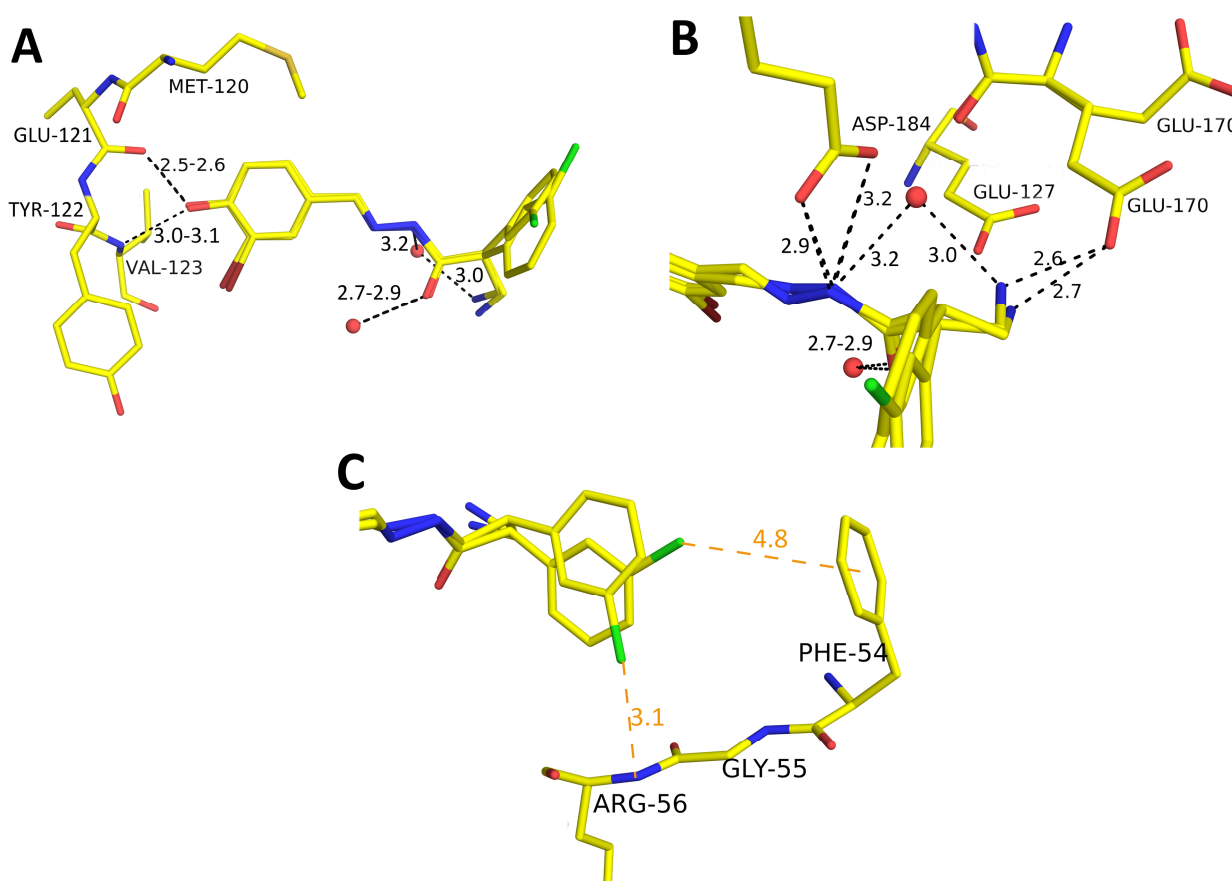


Abbildung 7.4: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 68s. In dieser Struktur wurde der Ligand **68** in die Elektronendichte eingepasst. (A) Die Scharnierregion wird von der Hydroxygruppe adressiert. (B) Asp184 steht in Wechselwirkung mit der Hydrazinfunktion des Liganden. Außerdem besteht eine H-Brücke zwischen der Aminogruppe und Glu170, sowie einem Wassermolekül. (C) Der Chlorsubstituent steht in Halogenwechselwirkungen mit Phe54 und Arg56N. Die Elektronendichte für den Liganden ist in **Abbildung 9.5** gezeigt.

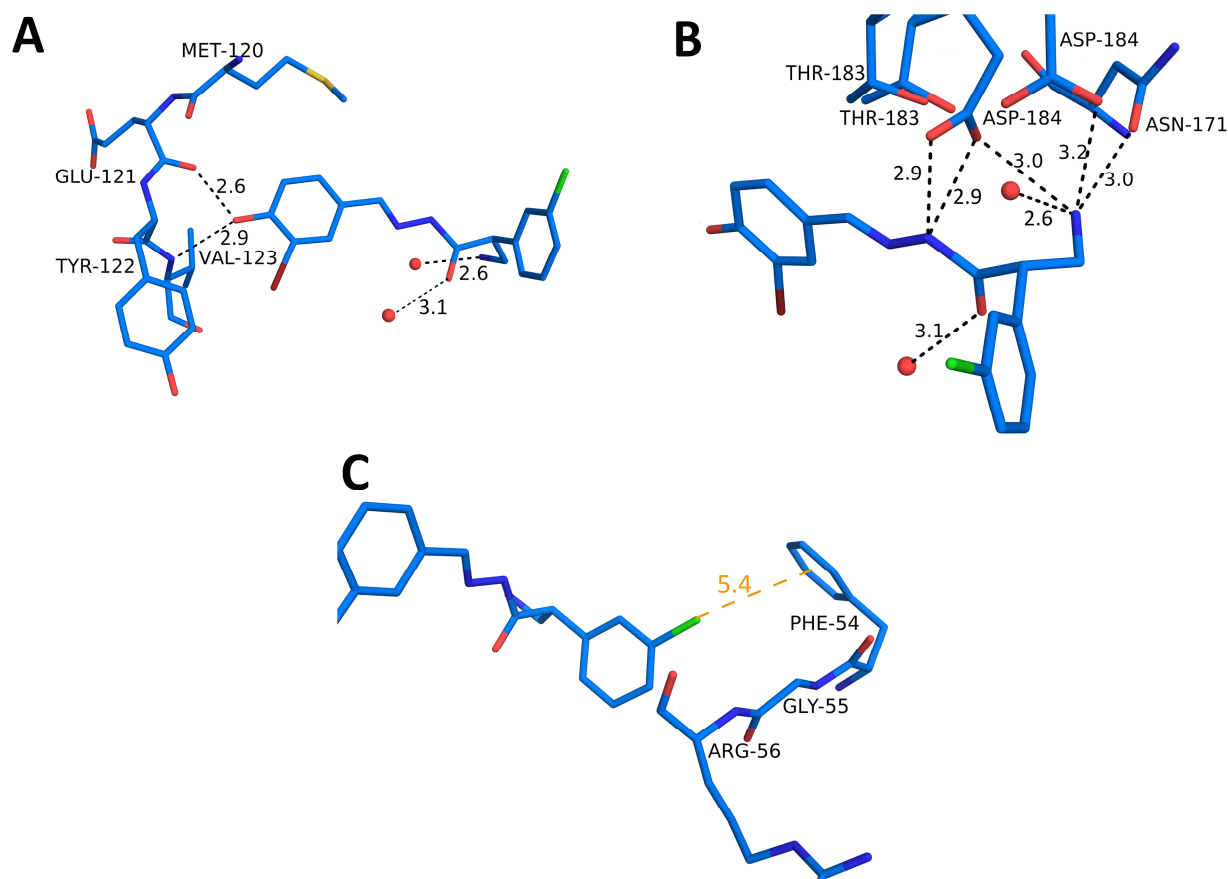


Abbildung 7.5: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 67k. In dieser Struktur wurde der Ligand **68** in die Elektronendichte eingepasst. (A) Die Scharnierregion wird von der Hydroxygruppe adressiert. (B) Asp184 steht in Wechselwirkung mit der Hydrazinfunktion und der Aminogruppe des Liganden. Weiterhin besteht eine H-Brücke von der Aminogruppe zu einem Wassermolekül und Asn171. (C) Der Chlorsubstituent steht in Wechselwirkung mit Phe54. Die Elektronendichte für den Liganden ist in **Abbildung 9.4** gezeigt.

In den kokristallisierten Strukturen treten leichte Unterschiede untereinander und auch im Vergleich zu den *gesoakten* Varianten auf. Allerdings wird nach dieser Methode ebenfalls nur der *S*-konfigurierte Ligand **68** gefunden, wenngleich die Kokristallisationen vermeintlich mit dem *R*-konfigurierten **67** und dem *S*-konfigurierten **68** in zwei unterschiedlichen Ansätzen erfolgten. Auf diesen Aspekt soll jedoch erst im Diskussionsteil näher eingegangen werden.

Die Bindung an der Scharnierregion mit der Hydroxyfunktion des Liganden findet wie auch in den *gesoakten* Strukturen über eine H-Brücke in nahezu gleichen Abständen statt (Abstände zu

Glu121O = 2.5-2.6 Å und zu Val123NH = 2.9-3.1 Å, vergleiche **Abbildung 7.3-Abbildung 7.6 A**). Die Abstände zwischen der Seitenkette von Asp184 und den Liganden weisen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu den Abständen auf, die in den *gesoakten* Varianten gefunden wurden, sodass auch hier H-Brücken ausgebildet werden (**67k**: 2.9, 2.9 Å, **68k**: 2.9-3.0, 3.1 Å und **67s/68s**: 2.8-2.9, 3.2 Å). **67k** ist die einzige Struktur in der Asp184 eine alternative Konformation einnimmt und eine H-Brücke zur Aminogruppe des Liganden ausbildet (3.0-3.2 Å, siehe **Abbildung 7.5 B**). Ein weiterer Unterschied ist, dass die Aminogruppe von **68** in **68k** lediglich eine wasserverbrückte Wechselwirkung mit Thr51Oy eingeht (2.6-2.7 Å zu Wassermolekül und 2.7 Å zu Thr51, vgl. **Abbildung 7.6 B**). In **67k** wird hingegen eine H-Brücke zu einem anderen Wassermolekül (2.6 Å) und der Seitenkette von Asn171 (3.0 Å) ausgebildet (**Abbildung 7.5 B**).

Interessanterweise kann in **67k** lediglich eine Konformation des Chlorbenzolrings gefunden werden. Dieser ist zur Seitenkette von Phe54 orientiert (5.4 Å, vgl. **Abbildung 7.5 C**). Für **68k** werden die gleichen Orientierungen wie für die *gesoakten* Strukturen gefunden, sodass auch hier zwei unterschiedliche Wechselwirkungen des Chlorsubstituenten vorgefunden werden (4.7 Å zu Phe54 und 3.4 Å zu Arg56N, siehe **Abbildung 7.6 C**). Weiterhin wird in **67s**, **68s** und **67k** eine H-Brücke zwischen dem Carbonylsauerstoff des Liganden und einem Wassermolekül ausgebildet. In **68k** kann dieses Wassermolekül nicht gefunden werden. An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass die kristallographische Auflösung des Datensatzes **68k** um 0.5 Å geringer ist als für **67k** (**68k**: 2.0 Å und **67k**: 1.5 Å) und daher insgesamt weniger Wassermoleküle gefunden werden.

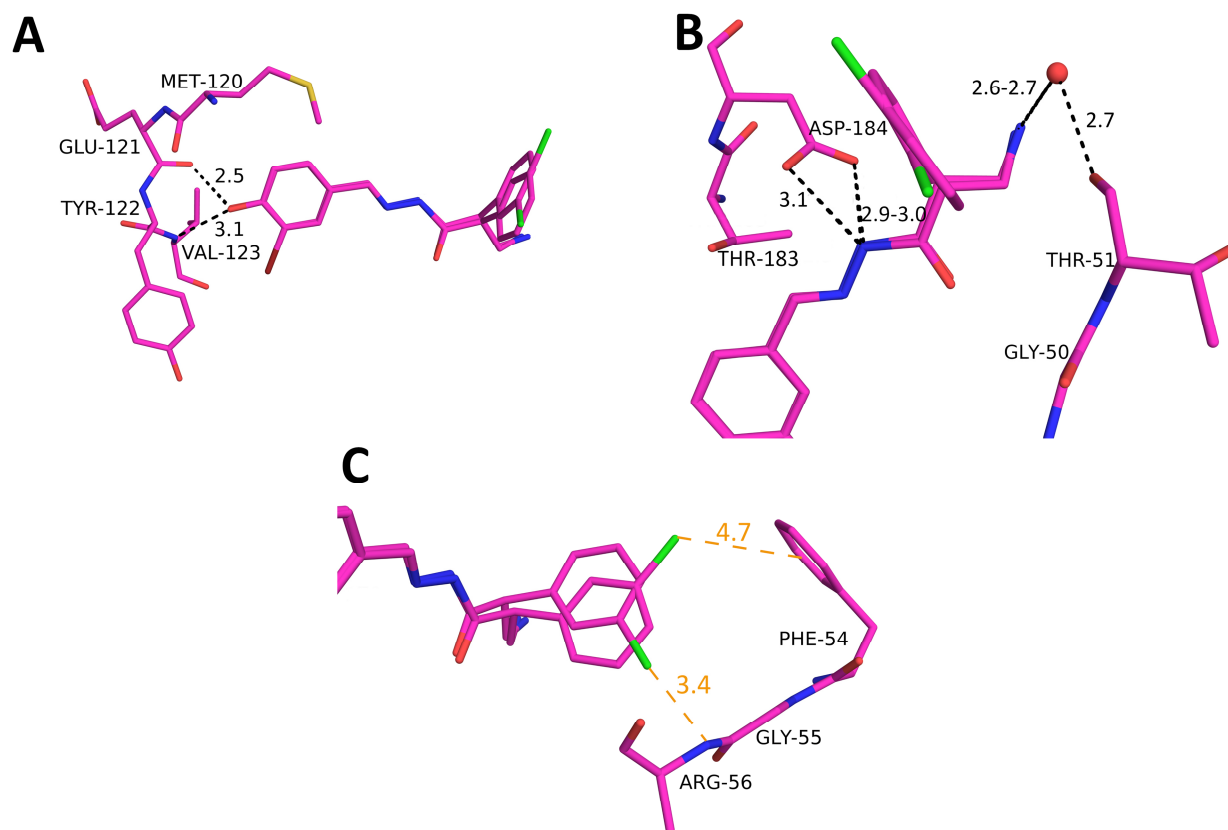


Abbildung 7.6: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 68k. In dieser Struktur wurde der Ligand **68** in die Elektronendichte eingepasst. **(A)** Die Scharnierregion wird von der Hydroxygruppe adressiert. **(B)** Asp184 steht in Wechselwirkung mit der Hydrazinfunktion des Liganden. Die Aminogruppe zeigt keine Wechselwirkungen zu Wassermolekülen oder dem Protein. **(C)** Der Chlorsubstituent steht in Halogenwechselwirkungen mit Phe54 und Arg56N. Die Elektronendichte für den Liganden ist in **Abbildung 9.5** gezeigt.

In einer FRET-basierten Versuchsreihe wurden die Liganden **66-69** auf ihre inhibitorische Wirkung an der CHO PKA untersucht. Die Messungen lieferten, wie der **Tabelle 7.2** zu entnehmen ist, keine signifikanten Affinitätsunterschiede.

Tabelle 7.2: Ergebnisse der FRET-basierten Untersuchungen zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung der Liganden 66-69 auf die CHO PKA.

ID	K_i [μ M]
66	0.7 \pm 0.2
67	0.7 \pm 0.2
68	0.7 \pm 0.1
69	0.6 \pm 0.1

Dieses überraschende Ergebnis wirft drei Fragen auf: Ist die Genauigkeit dieses Assays zu gering, um die beobachteten Affinitäten voneinander zu unterscheiden? Welche Verbindung ist daher die mit der höchsten Affinität zur PKA? Oder weisen die Liganden keine signifikant unterschiedlichen inhibitorischen Wirkungen auf?

Daher wurde ein röntgenkristallographisches Experiment durchgeführt, in dem die racemischen Gemische der β -/ γ -Aminosäure-Derivate in einer 1:1-Mischung in dem *Soaking*-Puffer vorlagen und ein PKA-Kristall in diese Lösung getränkt wurde. Dieses Experiment gibt Aufschluss über die affinste Verbindung in Bezug auf einen PKA-Proteinkristall. Die tatsächliche Affinität in Lösung kann damit nicht abschließend geklärt werden, es könnte jedoch einen ersten Hinweis bieten. **Abbildung 7.7 A-C** zeigt das Ergebnis, in welchem erneut nur das *S*-konfigurierte **68** in die Elektronendichte (**Abbildung 9.5**) eingepasst werden konnte. Daher scheint diese Verbindung die höchste Affinität dieser Serie in Bezug auf einen PKA-Proteinkristall aufzuweisen.

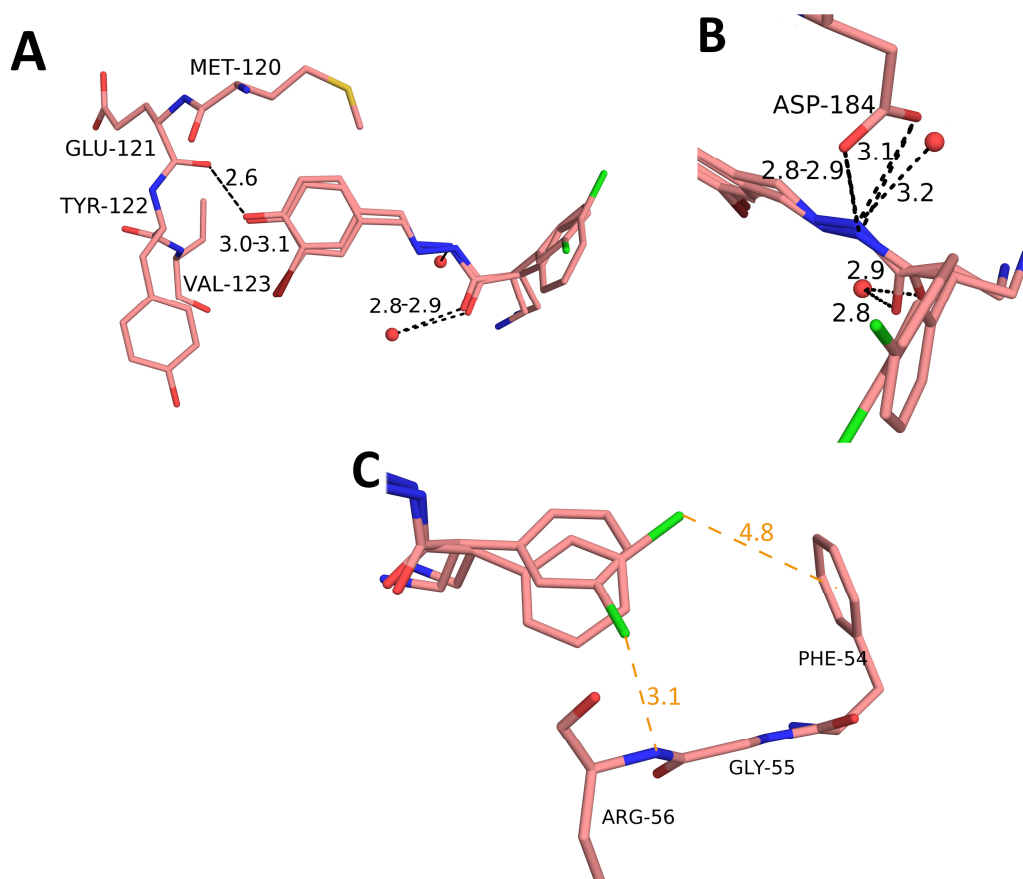


Abbildung 7.7: Darstellung der aktiven Tasche der PKA mit 68 (72s). Die Struktur 72s wurde nach einem Soaking-Experiment erhalten, in dem die racemischen Gemische 66 und 69 in einem 1:1-Gemisch vorlagen. In die aus dem Experiment resultierende Elektronendichte konnte der Ligand 68 eingepasst werden. (A) Die Scharnierregion wird von der Hydroxygruppe adressiert. (B) Asp184 steht in Wechselwirkung mit der Hydrazinfunktion des Liganden, welche zusätzlich in Kontakt zu einem Wassermolekül steht. Die Aminogruppe hat in einem Radius von 3.2 Å keinen Interaktionspartner. (C) Der Chlorsubstituent steht in Halogenwechselwirkungen mit Phe54 und Arg56NH. Die Elektronendichte für den Liganden ist in **Abbildung 9.5** gezeigt.

Im Folgenden wird die Rolle des Bromsubstituenten näher betrachtet. Die **Tabelle 7.3** zeigt eine Auflistung der Abstände des Bromsubstituenten zu möglichen Interaktionspartnern für eine Halogen- π -Wechselwirkung auf. Diese könnten für eine höhere Affinität des Liganden verantwortlich sein. Weitere Interpretationen befinden sich im nächsten Abschnitt (**7.4 Diskussion und Fazit**).

Tabelle 7.3: Auflistung der Abstände des Bromsubstituenten zu möglichen Interaktionspartnern. Hierbei wurde die Distanz von Brom zur Mitte des Seitenketten-Sechsrings gemessen. Die Abstände liegen zwischen 4.2 und 5.0 Å.

ID	Aminosäure	Abstand zu Bromsubstituent [Å]
67s	Tyr122	4.8-4.9
	Phe327	4.4-4.5
68s	Tyr122	4.7-4.8
	Phe327	4.2
67k	Tyr122	5.0
	Phe327	4.3
68k	Tyr122	4.9
	Phe327	4.4
66+69	Tyr122	4.7
	Phe327	4.3

Abschließend sei zusammengefasst, dass alle Kokristallstrukturen Abweichungen untereinander aufweisen. Jedoch wird in allen Fällen lediglich die Bindung des S-konfigurierten **68** an der Scharnierregion der PKA gefunden. Die nach dem *Soaking*-Verfahren erhaltenen Strukturen hingegen weisen nahezu keine Abweichungen untereinander auf. Auch in diesen Strukturen kann lediglich das S-konfigurierte **68** in die Elektronendichte eingepasst werden. Die hohen Auflösungen der nach dem *Soaking*-Verfahren erhaltenen Strukturen von 1.37-1.49 Å lassen eine zuverlässige Bestimmung der beobachteten Stereochemie zu.

7.4 Diskussion und Fazit

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass das S-konfigurierte **68** die höchste Affinität in der Serie (**66-69**) zu einem CHO PKA-Proteinkristall aufweist. Wichtige Bindemotive sind der Bromsubstituent (Halogen- π -Wechselwirkung zu Tyr122 und Phe327), die Hydroxygruppe (H-Brücke zu Glu121O und Val123NH), die Hydrazinfunktion (H-Brücke zu Asp184O δ), die Aminogruppe (entscheidend für die absolute Konfiguration und mögliche H-Brückenbildung zu Glu170O ϵ) und der Chlorsubstituent (Halogen- π - und Halogen-Stickstoff-Wechselwirkung zu Phe54 und Arg56N). Interessant ist hierbei vor allem der Chlorsubstituent, welcher in den Strukturen **67k**, **67s**, **68k**, **68s** und **72s** nicht optimal zur Seitenkette von Phe54 ausgerichtet scheint. In keiner der benannten Strukturen ist dieser orthogonal auf den Phenylring orientiert, was einer optimalen Ausrichtung entsprechen würde.^[128] Gleiches gilt

für den Bromsubstituenten, welcher ebenfalls in keiner der Strukturen orthogonal zu den Seitenketten von Tyr122 und Phe327 ausgerichtet ist.

Allerdings scheint die (mit Ausnahme von **67k**) auftretende zweite Konformation des Chlorphenylrings optimal auf den Peptidrückgrat-Stickstoff von Arg56 gerichtet zu sein.^[129] Außerdem ist der Abstand von 3.1-3.4 Å zwischen Chlorsubstituent und Arg56N optimal.^[130,131]

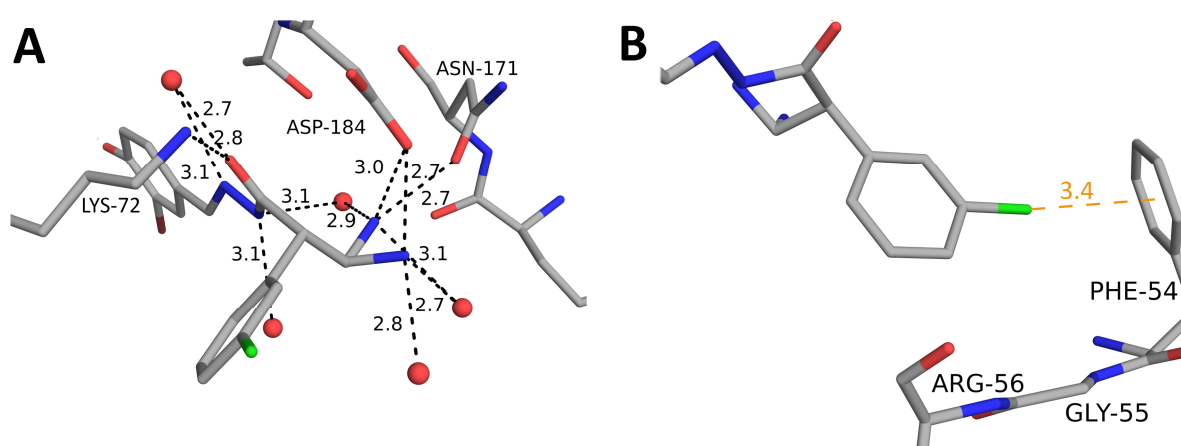


Abbildung 7.8: Darstellung der aktiven Tasche der humanen PKA mit 66. (A) Gezeigt sind die Wechselwirkungen des Liganden mit Lys72, Asn171, Asp184 und fünf Wassermolekülen. (B) Der Chlorsubstituent ist auf die Seitenkette von Phe54 gerichtet.

Im Gegensatz dazu zeigt der Chlorsubstituent der Liganden in den Strukturen **66k** und **69k** eine bessere Ausrichtung zur Seitenkette von Phe54 (vergleiche **66k** in **Abbildung 7.8 B**). Dies zeigt auch der Abstand zwischen dem Chloratom und dem Mittelpunkt des Phenylrings, welcher in beiden Fällen lediglich 3.4 Å beträgt. In den Strukturen, die in dieser Arbeit erhalten wurden, ist der Abstand mit 4.7-5.4 Å mindestens 1.3 Å größer. Das Besetzungsverhältnis der Chlorbenzolringe ist über alle Strukturen (**67s**, **68k**, **68s** und **72s**) gemittelt, die zwei Konformationen aufweisen, ausgeglichen (Details siehe **Abschnitt 9.2**). Keine der beiden möglichen Konformationen scheint daher präferiert vorzuliegen.

Eine weitere Auffälligkeit ist die Anordnung der Carbonylgruppe. Diese ist für die in **Abbildung 7.9 A** und **B** in unterschiedlichen Grautönen dargestellten Strukturen anders als für die farbig dargestellten (**Abbildung 7.9 B**). Erstere sind dabei Strukturen aus vorherigen Arbeiten (im Folgenden erste Reihe genannt: **66k** (unveröffentlicht von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT, SB288), **69k** (Doktorarbeit DR. HELENE KÖSTER, SB302), **70k** (unveröffentlicht von DR. BARBARA WIENEN-SCHMIDT, SB274) und **71k** (Doktorarbeit DR. HELENE KÖSTER, SB298, PDB-Code: 3P0M)) und in Farbe sind die Strukturen aus dieser Arbeit (im Folgenden zweite Reihe genannt: **67k**, **67s**, **68k**, **68s** und **72s**). Die erste Reihe weist aufgrund ihrer Orientierung der Carbonylgruppe H-Brückenbindungen zu Lys72N ζ auf. Außerdem kann die Aminogruppe in der ersten Reihe abweichend von der zweiten Reihe H-Brückenbindungen zu Asn171O δ und Asp184O δ ausbilden. Dies erfolgt in der zweiten Reihe nur in der Struktur **67k**. Interessant ist jedoch, dass auch im Fall der gräulich dargestellten Verbindungen lediglich die S-konfigurierte Variante in das Modell eingebaut werden konnte. An der Scharnierregion sind die Strukturen nahezu identisch und auch der Bromsubstituent zeigt für die erste Reihe keine signifikanten Abweichungen zu den in **Tabelle 7.3** aufgelisteten Abständen auf.

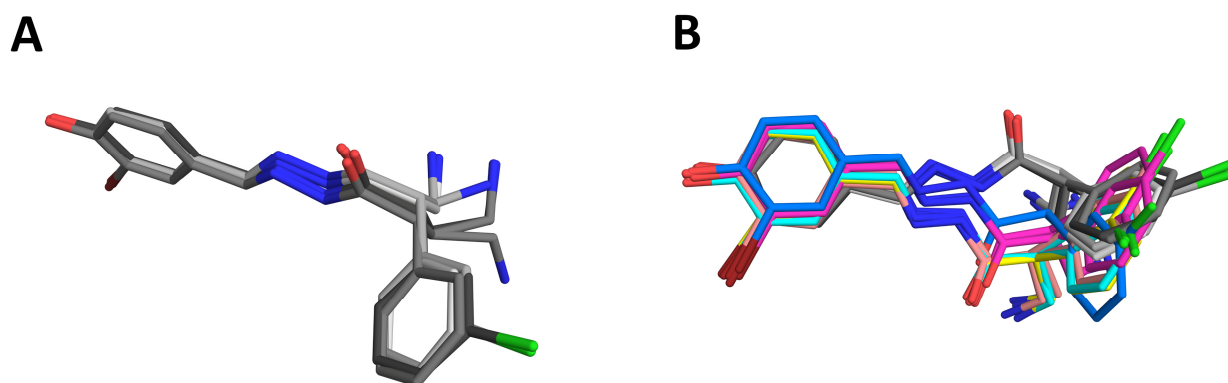


Abbildung 7.9: Vergleich der Strukturen aus vorherigen Arbeiten mit Strukturen, die in dieser Arbeit erhalten wurden. (A) Hier sind die in Grautönen dargestellten Strukturen gezeigt, welche in vorherigen Arbeiten erhalten wurden. Die Liganden (**66**, **69**, **70** und **71**) befinden sich in einem Komplex mit der humanen PKA. (B) Die bunt dargestellten Strukturen (**67k**, **67s**, **68k**, **68s** und **72s**) wurden in dieser Arbeit im Komplex mit der CHO PKA erhalten. Die Orientierungen dieser Liganden unterscheiden sich vor allem bezüglich des Carbonyl-Sauerstoffs zu denen, die bereits in A gezeigt wurden. Die Liganden aus A (grau) sind in dieser Darstellung ebenfalls gezeigt.

Mithilfe des *Soaking*-Experiments der beiden racemischen Gemische **66** und **69** konnte gezeigt werden, dass das *S*-konfigurierte **68** die affinste Verbindung in Bezug auf einen CHO PKA-Proteinkristall ist. Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht durch die Ergebnisse aus der FRET-basierten Versuchsreihe gestützt werden. Die ermittelten K_i -Werte sind aufgrund des vergleichsweise großen Fehlerbereichs nicht zu unterscheiden. Dies ist überraschend, da bei diesen eindeutigen kristallographischen Ergebnissen eine größere Diskrepanz der verschiedenen Ligand-Affinitäten an der PKA vermutet werden könnte. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Affinitäten der Liganden an einen Proteinkristall im Vergleich zu einem Protein in Lösung nicht identisch sein müssen.

Eindeutig ist jedoch, dass aufgrund der kristallographischen Ergebnisse zumindest ein geringer Teil der *S*-konfigurierten Verbindung **68** in der vermeintlich enantiomerenreinen Verbindung **67** vorliegen muss. Andernfalls könnte in der Röntgenkristallographie nicht das *S*-konfigurierte Derivat in der Elektronendichte wiedergefunden werden. Daher ist zu vermuten, dass auch die Verbindung **68** mit **67** verunreinigt ist. NMR-Spektren von HANS-DIETER GERBER legen eine Verunreinigung von etwa 3-4% in beiden Fällen nahe. Diese Spektren sind allerdings einige Syntheseschritte vor dem Endprodukt (**67** bzw. **68**) analysiert worden, da lediglich die dort vorhandenen Diastereoisomere eine Unterscheidung dieser mittels NMR-Spektroskopie ermöglichen. Daher ist nicht sicher, ob auch eine Racemisierung während des weiteren Syntheseverlaufs stattgefunden haben könnte. Das würde die nicht unterscheidbaren K_i -Werte der Messreihe erklären. Allerdings konnte diese Theorie mithilfe einer Bestimmung des Drehwerts von **67** und **68** durch HANS-DIETER GERBER widerlegt werden, da racemische Gemische, entgegen der hier erhaltenen Ergebnisse (freie Base von **67**: $[\alpha]_D^{25} = 19.5^\circ$ und freie Base von **68**: $[\alpha]_D^{25} = -18.6^\circ$), keinen Drehwert aufweisen dürfen. Da das Endprodukt keine Diastereoisomerie aufweist, kann lediglich der Einsatz eines chiralen Reagenzes zur Bildung von Diastereoisomeren genutzt werden, um die tatsächliche Verunreinigung des Endprodukts mit dem jeweils anderen Enantiomer zu bestimmen. Diese Messungen waren bisher nicht erfolgreich, sodass diese Frage ungeklärt bleibt.

Darüber hinaus bleibt unklar, warum die Liganden in den Strukturen mit der humanen PKA eine abweichende Konformation zu den Liganden aufweisen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.

7.5 Experimentelle Durchführung

Der folgende Abschnitt beinhaltet die Durchführung der FRET-Versuchsreihe, welcher auf dem Versuchsprotokoll^[35] des *Assay-Kit*-Vertreibers basiert. Für den kristallographischen Teil gibt es in **Kapitel 8** einen eigenen Abschnitt, in welchem alle kristallographischen Versuche dieser Arbeit beschrieben werden.

Für die Probenvorbereitung wurden die zu untersuchenden Verbindungen (**66-69**) in DMSO (100 mM) gelöst. Aus diesen Lösungen wurden 4 µL entnommen und 96 µL dest. H₂O hinzugefügt. Im Folgenden wurde eine Verdünnungsreihe mit einer DMSO-Lösung (4% in H₂O) hergestellt, in welcher die Ligandenkonzentrationen 1000, 100, 50, 16, 12, 8, 4 und 1 µM, sowie 500, 250 und 100 nM enthalten waren.

In eine schwarze 384er Titerplatte von GREINER BIO-ONE für Mikroliter-Volumina wurden für die Testreihe zunächst 2.5 µL der einzelnen Verdünnungen in eine Titerplattenvertiefung pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 5 µL des Kinase/Peptid-Mixes. Dieser bestand zu gleichen Teilen aus einer Proteinlösung (PKA 50 ng/mL) und einer Lösung des zu phosphorylierenden Peptids (Z'LYTE™ Ser/Thr 1 Phospho-Peptid, 8 µM). Beide Lösungen wurden mit einem 1.33-fachen Kinase-Puffer hergestellt, welcher aus 250 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM Magnesiumchlorid, 5 mM EGTA und 0.05% BRIJ-35 bestand. Die Werte sind hierbei auf den einfachen Kinase-Puffer bezogen. Der 1.33-fache Kinase-Puffer wurde ebenfalls in jede Titerplattenvertiefung pipettiert (2.5 µL).

Für die Kontrollmessungen, wurden je drei Mal drei Titerplattenvertiefungen benötigt. Die erste Spalte ist die 100%-Inhibitionskontrolle, in welche je 2.5 µL DMSO (4% in H₂O), 5 µL Kinase/Peptid-Mix und 2.5 µL 1.33-facher Kinase-Puffer pipettiert wurden. In der zweiten Spalte wurden 2.5 µL DMSO (4% in

H₂O) und 5 µL Kinase/Peptid-Mix für die 0%-Inhibitionskontrolle pipettiert. Die 100%-Phosphorylierungskontrolle befand sich in der dritten Spalte und enthielt 2.5 µL DMSO (4% in H₂O), 5 µL Phospho-Peptid-Lösung (Z'-LYTE™ Ser/Thr 1 Phospho-Peptid, 8 µM in 1.33-fachen Kinase Puffer) und 2.5 µL 1.33-facher Kinase-Puffer.

Zum Start der Phosphorylierung wurden allen Titerplattenvertiefungen, mit Ausnahme der 100%-Phosphorylierungskontrolle, 2.5 µL einer 16 µM ATP-Lösung (in 1.33-fachen Kinase-Puffer) hinzugefügt. Nach einer Zeit von 1h bei Raumtemperatur wurde der nächste Reaktionsschritt gestartet.

In diesem Reaktionsschritt erfolgt eine Spaltung des nicht-phosphorylierten Peptids. Hierzu wurden 5 µL einer sogenannten Entwicklungs-Lösung in alle Vertiefungen hinzugefügt. Die Lösung bestand aus dem Entwicklungsreagenz A und einem Entwicklungspuffer, welcher in dem vorgefertigten *Kit* enthalten war. Die genaue Herstellungsverfahren wurde gemäß des Analysenzertifikats auf der Internetseite des Vertreibers durchgeführt und ist für jede Charge leicht abweichend.

Nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur wurden 5 µL einer vorgefertigten Stopp-Lösung in jede Titerplattenvertiefung gegeben, wodurch die Spaltung unterbrochen wurde.

Anschließend erfolgten Fluoreszenz-basierte Messungen an einem TECAN SAFIRE II *Microplate-Reader*. Für jedes *Well* wurde zunächst die Emissionsintensität für Coumarin bei 445 nm und daraufhin die Emission für Fluorescein bei 520 nm gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug für beide Messungen 400 nm. Weitere Einstellungen: Anzahl der Messungen: 10, Bandbreite der Anregungs- und Emissionswellenlängen: 10 nm, Modus: hohe Sensitivität, Integrationszeit: 2000 µs, Z-Position: 12300 µm, Temperatur: Raumtemperatur.

Die K_i -Werte für die Verbindungen **67** und **68** wurden in einer fünffachen Bestimmung und für die Verbindungen **66** und **69** in einer dreifachen Bestimmung ermittelt. Die für diese Bestimmung benötigten Ergebnisse der ATP-Verdünnungsreihe wurden aus **Kapitel 6** entnommen, sodass hier keine erneute Messung erfolgte.

Zusammenfassung

In den letzten Jahren kommt in der industriellen Forschung der Hochdurchsatz-Musterung von großen Molekülbibliotheken zur Findung neuer biologisch aktiver Substanzen eine immer größere Bedeutung zu. Diese Bibliotheken zeichnen sich durch eine hohe Diversität aus, sodass ein möglichst großer chemischer Raum abgedeckt wird. Bezüglich ihres Molekulargewichts gleichen die untersuchten Moleküle oftmals dem eines finalen Wirkstoffs. Da hier eine Überlagerung verschiedener Effekte der einzelnen Substituenten auftritt, können diese nicht separat voneinander betrachtet werden, sodass die Wirkung der einzelnen Substituenten und somit die weitere Optimierung nur schwer abgeschätzt werden kann. Beim Fragment-basierten Ansatz hingegen werden kleine Moleküle gefunden, welche in Folge besser an das Zielprotein angepasst werden können. Das ist damit zu begründen, dass Fragmente relativ ungestört mit optimaler Orientierung an das Zielprotein binden können.

Ein Beispiel für die sukzessive Erweiterung eines Fragments hin zu einem Binder im nanomolaren Affinitätsbereich ist in **Kapitel 7** gegeben. Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten bereits verschiedene Wirkstoffkandidaten mit hoher Affinität zu der Proteinkinase A. Allerdings wurden die Verbindungen lediglich als racemische Gemische erhalten, sodass das affinste Derivat in einer neuen Synthese stereoselektiv hergestellt wurde. Allerdings wurde im Zuge dieser Arbeit erneut nur die *S*-konfigurierte Verbindung in verschiedenen Protein-Ligand-Komplexstrukturen gefunden. Dieses deutet auf eine Verunreinigung der vermeintlich stereoselektiv hergestellten Verbindungen mit dem jeweils anderen Enantiomer hin. Dabei konnte nicht festgestellt werden, ob eine teilweise Racemisierung durch die erforderlichen Synthesebedingungen erfolgte. Abschließend wird aus den röntgenkristallographischen Ergebnissen vermutet, dass das *S*-konfigurierte β -Aminosäure-Derivat die höchste Affinität zu der PKA aufweist.

In einem weiteren Projekt (**Kapitel 6**) erfolgte ebenfalls eine Erweiterung der Strukturen, welche aus einer initialen *in silico* Durchmusterung einer Fragment-Bibliothek als Treffer identifiziert wurden. Die Fragment-Bibliothek stellt hierbei eine Alternative zu üblichen Bibliotheken dar, da die Fragmente aus Naturstoffen abgeleitet sind. Mit dieser wurde die Hoffnung verknüpft neue Leitstrukturen für die

Proteinkinase A zu finden. Aus 22 Folgeverbindungen konnten in einer Versuchsreihe mit einem FRET-basierten Assay neun Verbindungen gefunden werden, welche eine inhibitorische Wirkung auf die PKA haben. Dieses entspricht einer Trefferquote von 41%. Allerdings sind bisher die kristallographischen Versuche, die Liganden mithilfe der *Soaking*-Methode in der aktiven Tasche der PKA zu populieren, gescheitert. Ein Grund für das Ausbleiben einer Bindung nach der *Soaking*-Methode, könnte der sterische Anspruch der untersuchten Moleküle darstellen, welcher die Diffusion durch die Lösungsmittelkanäle verhindert. Daher wurden Kokristallisationsversuche gestartet, welche eine Bildung der Protein-Ligand-Komplexe ermöglichen sollte. Für jeden Liganden wurde je ein Kokristallisationsansatz angefertigt, von dem in sieben Fällen Kristalle erhalten werden konnten. Die röntgenkristallographischen Messungen und die Interpretation der Daten ergaben einen Treffer. Weiterhin können noch Anpassungen der Kristallisationsbedingungen vorgenommen werden, um weitere Kristalle der Protein-Ligand-Komplexe zu erhalten. Bisher konnte ein Protein-Ligand-Komplex röntgenkristallographisch beobachtet werden.

In den weiteren Projekten wurden Fragmente untersucht, die noch nicht erweitert wurden. So konnten in **Kapitel 2** die Merkmale der ATP-Bindetasche der Proteinkinase A ausgeleuchtet werden, indem hier für eine Reihe von Fragmenten die Wechselwirkungen mit der Scharnierregion der Kinase untersucht wurden. Diese Studie zeigt, dass sowohl eine Carbonsäure- und Carboxamidgruppe als auch eine Amidinogruppe im ungeladenen Zustand das H-Brückenbindungsmuster der Scharnierregion erfüllt. Allerdings muss hierfür das Molekül mit einer geeigneten elektronenschiebenden oder -ziehenden Gruppe ausgestattet werden, um den notwendigen Protonierungszustand sicherzustellen. Um solche elektronischen Eigenschaften vorherzusagen, werden allerdings aufwendige quantenmechanische Berechnungen benötigt, die noch nicht routineweise durchführbar sind. Solange können die in diesem Projekt erhaltenen experimentellen Informationen, neben den bestehenden Konzepten, als Anhaltspunkte für Überlegungen zur Erweiterung von initialen Leitstrukturen dienen.

In **Kapitel 3** wurde das Konzept der Kokristallisation mit dem des *Soakings* verglichen, indem Strukturen mit verschiedenen Liganden nach beiden Methoden erhalten wurden. Es zeigten sich unterschiedliche

Orientierungen der nach beiden Methoden erhaltenen Strukturen. Diese traten vor allem bei Liganden mit mehr Freiheitsgraden auf. Demnach erscheint das *Soaking* für Fragmente gut geeignet, zumal das die zeit- und ressourcensparende Methode darstellt. Für größere Verbindungen mit mehr Freiheitsgraden erscheint die Kokristallisation die Methode der Wahl, da sie das zuverlässigere Bild darzustellen scheint. Diese Vermutung wurde durch NMR-Studien bekräftigt, sodass wir uns über unsere Aussage im untersuchten Fall sicher sind.

Eine röntgenkristallographische Durchmusterung von Bibliotheken chemischer Verbindungen nach der *Soaking*-Methode stellt vor allem bei der nicht vollständig automatisierten Auswertung und Interpretation der Daten einen großen Aufwand dar. In **Kapitel 4** wird eine Methode entwickelt, um die Bindung von chemischen Verbindungen an die Scharnierregion der PKA im Proteinkristall anzuzeigen. Dadurch wird eine unnötige Aufnahme der röntgenkristallographischen Daten im Falle einer ausbleibenden Bindung der zu untersuchenden Verbindungen vermieden. Das Prinzip beruht auf einen fluoreszierenden Reporter-Liganden, welcher zuvor in der Bindetasche des PKA-Kristalls populierte wird. Dieser Kristall zeigt eine Fluoreszenzemission, welche durch das Verdrängen des Reporter-Liganden ausgelöscht werden sollte. Das Auslöschen der Fluoreszenz zeigt eine Bindung des Test-Liganden an, sodass die Vermessung des Kristalls an einer Strahlenquelle sinnvoll ist. In dieser Arbeit konnte Aminofasudil als ein Reporter-Ligand gefunden werden, welcher von Staurosporin und Isochinolin verdrängt werden konnte. Allerdings wies der Kristall im Fall der Verdrängung mit dem Fragment Isochinolin weiterhin eine Fluoreszenzemission auf, die allerdings eine Änderung des Emissionsspektrums hervorrief. Diese Änderung könnte für das Anzeigen einer erfolgreichen Verdrängung und somit für eine erfolgreiche Bindung des zu untersuchenden Liganden genutzt werden. Vermutet wird, dass diese Änderung auf das Verdrängen des Reporter-Liganden aus der Bindetasche der PKA resultiert, welcher vermutlich weiterhin in den Lösungsmittelkanälen des Kristalls vorhanden ist und das veränderte Fluoreszenzemissionsspektrum bewirkt.

Die in **Kapitel 5** untersuchten Fragmente basieren auf dem natürlichen Substrat ATP der PKA und dem bekannten Wirkstoff Fasudil. Das Ziel war die thermodynamische und kristallographische

Bindungscharakterisierung dieser Fragmente an der PKA und die Klärung möglicher Unterschiede. Interessant ist vor allem die kleinste Verbindung der Serie Isochinolin, welche eine unerwartet hohe Affinität zum Zielprotein zeigt. Außerdem bindet diese, im Vergleich zu dem Wirkstoff Fasudil, in einer alternativen Bindungspose, das Isochinolin als Grundgerüst enthält. Diese Untersuchungen zeigen unter anderem, dass die Entwicklung eines Wirkstoffs auf Grundlage von der Kristallstruktur mit Isochinolin eine alternative Erweiterungsstrategie zur Folge gehabt hätte. Eine Erweiterung wäre demnach in 6-Position anstelle der gewählten 5-Position naheliegend gewesen. Außerdem zeigt sich, dass eine bivalente Bindungsweise an der Scharnierregion zu keiner Affinitätsverbesserung führt und diese vor allem bei den schwächer bindenden Fragmenten vorliegt.

Summary

In recent years, high-throughput screenings of large libraries of chemical compounds for the discovery of new biologically active substances have become increasingly important for the industrial research. The compounds of those libraries show a high diversity to cover a large chemical space. One disadvantage is, that these compounds mostly have similar molecular weights compared to approved drugs. Since different effects of the individual substituents occur, they cannot be considered separately from each other, so that the effect of the substituents and thus the further optimisation can only be estimated with difficulty. In the fragment-based approach, on the other hand, small molecules are found which can subsequently be adapted to the target protein. Fragments adopt perfect orientations to their target protein, because they only have a few numbers of possible interaction sites and no overlayed effects influence these findings.

An example of the consecutive expansion of a fragment to a ligand with nanomolar affinity to PKA is given in **chapter 7**. Previous studies already showed some possible drug candidates with high affinities to PKA. However, these compounds were only obtained as racemic mixtures, so that the measured affinities do not represent the final values of the individual compounds. Therefore, a stereoselective synthesis was done to obtain the *R*- and *S*-enantiomers separated from each other. Surprisingly only the *S*-configured compound was found in the different crystal structures of the protein-ligand complexes. This indicates a contamination of the supposedly stereoselectively prepared *R*-configured compound with the *S*-configured one, which seems to be more potent. Further studies did not resolve, if this could be due to a partial racemisation favoured by the applied synthesis conditions. Finally, from the X-ray crystallographic results, the *S*-configured β -amino acid derivative is supposed to be the compound with the highest affinity to PKA.

Another expansion of fragments was performed in another project (**chapter 6**). Here, fragments were chosen from an initial *in silico* screen of a fragment library and expanded follow-up compounds were studied. The fragment library represents an alternative to conventional libraries, as the fragments are derived from natural products. The aim was to find new lead structures for protein kinase A. In a FRET-

based assay nine out of 22 follow-up compounds were found to have an inhibitory effect on PKA. However, crystallographic attempts to accommodate the ligands in the active pocket of the PKA using the soaking method have failed. One reason for this could be the steric requirement of the molecules, which prevents diffusion through the solvent channels. Therefore, cocrystallisation experiments were started, which should enable the formation of the protein-ligand complex. For each ligand one cocrystallisation set was prepared, from which crystals could be obtained in seven cases. X-ray crystallographic measurements and the analysis of the data resulted in one hit. Furthermore, adjustments of the crystallisation conditions can still be made to obtain more crystals of the protein-ligand complexes. So far, one protein-ligand complex could be found from an X-ray crystallographic experiment.

In the other projects, fragments series were studied to get different informations. For example, in **chapter 2**, the characteristics of the ATP-binding pocket of protein kinase A could be described by studying the interactions between the chosen fragments with the hinge region of the kinase. This study shows that a carboxylic acid and carboxamide group as well as an amidino group in the uncharged state accomplish the H-bonding pattern of the hinge region. However, this requires the molecule to be equipped with a suitable electron-pushing or -pulling group to ensure the protonation state needed. In order to predict such electronic properties, elaborate quantum mechanical calculations are required, which are not yet routinely feasible. In the meantime, the results of this project can be used in addition to existing concepts to serve as a guide for the expansion of initial lead structures.

Chapter 3 compares the concept of cocrystallisation with that of soaking. For this, protein-ligand complexes with different ligands were compared by both methods. Different orientations of the structures obtained by both methods were found. For ligands with more degrees of freedom, larger differences were observed. Thus, soaking appears to be well suited for fragments, because of its time- and cost-effectiveness. Compounds with more degrees of freedom should be cocrystallized to present the more reliable picture.

X-ray crystallographic screenings of libraries by soaking is very time-consuming. This is especially the case, if the evaluation and interpretation of the data is not fully automated. A method to indicate the binding of chemical compounds to the hinge region of a PKA-crystal is developed and validated in **chapter 4**. One advantage to see fragment binding by simple means is, that the recording of X-ray crystallographic data can be redundant, if the compounds to be studied actually fails to bind. The applied method is based on a fluorescent reporter ligand, which is first of all populated in the binding pocket of the PKA crystal via soaking. From this time on, the crystal shows a fluorescence emission. By displacement of the reporter ligand, the fluorescence emission should be extinguished. Thus, in the absence of the fluorescence the protein-fragment complex structure to be studied should be measured by X-ray crystallography. In this work, aminofasudil was found to be a suitable reporter ligand and could be displaced by staurosporine and isoquinoline. In the experiment with isoquinoline the crystal unfortunately still emitted fluorescence. Nevertheless, the fluorescence spectrum changed, which could also be used as an indicator for the successful binding of the fragment/ligand of interest.

The fragments studied in **chapter 5** are based on the natural substrate of PKA (ATP) and an approved drug (Fasudil). The aim was to characterise the binding of these fragments at PKA by isothermal titration calorimetry and X-ray crystallography and to look for possible differences. The smallest compound in this series, isoquinoline, surprisingly shows a high affinity to the target protein. Compared to Fasudil, this molecule binds in an alternative binding pose, even though isoquinoline is a motive in Fasudil. This short example shows, that a development of a drug, based on the crystal structure with isoquinoline, might have resulted in an alternative expansion strategy. On the basis of these findings, an extension in the 6-position instead of the chosen 5-position might have been chosen. In this chapter it is also shown that a bivalent binding motive at the hinge region does not lead to a gain in affinity. This motive is mainly present in the binding event of the weaker binding fragments.

8. Experimenteller Teil

Dieses Kapitel behandelt die eingesetzten Materialien und Methoden zur Durchführung der zuvor beschriebenen Projekte (**Kapitel 2-7**). Sofern eine Durchführung nur auf ein bestimmtes Experiment oder Kapitel in dieser Arbeit zutrifft, wird dies explizit im jeweiligen Kapitel beschrieben.

8.1 Expression und Aufreinigung

Die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A aus den Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters (engl. *chinese hamster ovary*, CHO) wurde auf Grundlage des in der Arbeitsgruppe SCHWALBE (Universität Frankfurt/Main) entwickelten Protokolls exprimiert und aufgereinigt.^[132] Diese Untereinheit wurde in einem modifizierten pET16b Vektor mit einer His-Markierung erhalten. Weiterhin befindet sich eine mittels TEV-Protease (engl. *tobacco etch virus*) spaltbare Schnittstelle zwischen dieser Markierung und dem N-Terminus des Proteins. Das Plasmid wurde für eine Transformation in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS (NOVAGEN) verwendet.^[132]

Für die rekombinante Expression wurde das ZYM 5025 Medium^[133] (siehe **Tabelle 8.1** und **Tabelle 8.2**) verwendet. Nach dem Animpfen des Mediums über einen Glycerol-Stock (*E. coli* Stamm siehe oben) wurde dieses neun Stunden bei 37°C geschüttelt. Nach dem Abkühlen auf 20°C wurde die Expression mit einer IPTG-Zugabe induziert und das Medium etwa 60 Stunden weitergeschüttelt.

Durch Zentrifugation des Mediums (15000 g, 10 min, 4°C) wurde ein Zellpellet erhalten, welches in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einem Phosphatpuffer (siehe **Tabelle 8.3**) resuspendiert wurde. Der Zellaufschluss und das Homogenisieren des Zelllysats wurden mithilfe eines EmulsiFlex-C5 von AVESTIN unter hohem Druck (15-17k psi) realisiert.

Die Aufreinigung der Proteinkinase A wurde über drei Reinigungsschritte durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Lysat auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen, um nicht spezifisch bindende Bestandteile

abzutrennen. Die PKA wurde über einen Gradienten von 10 zu 500 mM Imidazol mit 200 mL Puffervolumen von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mit der TEV-Protease versetzt und zwei Tage bei 4°C für eine Entfernung des Imidazols und zur Abspaltung der His₇-Markierung dialysiert (Dialysepuffer siehe **Tabelle 8.3**). Im nächsten Schritt wurde eine inverse Ni-NTA durchgeführt, bei welcher die PKA im Durchfluss erhalten wurde. Eine weitere Dialyse bei 4°C zur Überführung des Proteins in einen salzarmen HEPES-Puffer (siehe **Tabelle 8.3**) führte zum letzten Schritt der Aufreinigung. Die Dialyse sollte möglichst kurzgehalten werden, da sich eine geringe Stabilität der PKA in dem salzarmen Puffer gezeigt hat. Das Protein wurde auf eine Kationenaustauschersäule (MonoS™ von GE HEALTHCARE) geladen und mit einem Salzgradienten bis 200 mM Natriumchlorid eluiert. Es wurden mehrere Fraktionen gesammelt, welche jeweils unterschiedliche Phosphorylierungsstufen der PKA aufwiesen. Die Proteinlösungen konnten direkt verwendet oder nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -78°C aufbewahrt werden.

Tabelle 8.1: Auflistung des 1000-fachen Spurenmetall-Mix für die Zugabe zum Expressionsmedium. Die Konzentrationen (c_{Vorrat}) und Einwaagen beziehen sich auf die Vorratslösungen zur Erstellung des 1000-fachen Spurenmetall-Mix, welcher die endgültige Zielkonzentration c_{Ziel} aufweist.

Chemikalien	MW [g/mol]	c_{Vorrat} [mM]	c_{Ziel} [mM]	V [L]	m [g]
FeCl ₃ Hexahydrat	270.30	100	50	1	27.030
CaCl ₂	110.99	40	20	1	4.440
MnCl ₂ Dihydrat	161.88	20	10	1	3.238
ZnSO ₄ Heptahydrat	287.54	20	10	1	5.751
CoCl ₂ Hexahydrat	237.93	4	2	1	0.952
CuCl ₂ Dihydrat	170.48	4	2	1	0.682
NiCl ₂ Hexahydrat	237.71	4	2	1	0.951
Na ₂ MoO ₄ Dihydrat	241.95	4	2	1	0.968
Na ₂ SeO ₃	172.94	4	2	1	0.692
H ₃ BO ₃	61.83	4	2	1	0.247

Tabelle 8.2: Zusammensetzung des ZYM-Mediums für die Expression.

Chemikalien	MW [g/mol]	c_{Ziel} [mM]	V [L]	m [g]
Na ₂ HPO ₄	141.96	25	4	14.20
KH ₂ PO ₄	136.09	25	4	13.61
NH ₄ Cl	53.49	50	4	10.70
Na ₂ SO ₄ Decahydrat	322.19	5	4	6.44
MgSO ₄ wasserfrei	120.40	2	4	0.96

Chemikalien	Anteil	V [L]	m [g] bzw. V [mL]
N-Z Amine / Trypton	1.00 %	4	40.0
Hefeextrakt	0.50 %	4	20.0
Glycerol	0.50 %	4	20.0
Glucose	0.05 %	4	2.0
Lactose	0.20 %	4	8.0
Spurenmittel-Mix	0.2x	4	0.800

Tabelle 8.3: Auflistung der verwendeten Puffer für die Aufreinigung der CHO PKA. Die pH-Werte wurde mit Natronlauge und Salzsäure eingestellt.

Puffer A für die Ni-NTA (pH 8.0)

Chemikalien	c (mM)	MW (g/mol)	V (L)	m (g)
Dinatriumhydrogenphosphat	50	141.96	1.0	7.10
NaCl	500	58.44	1.0	29.22
Imidazol	10	68.08	1.0	0.68

Puffer B für die Ni-NTA (pH 8.0)

Chemikalien	c (mM)	MW (g/mol)	V (L)	m (g)
Dinatriumhydrogenphosphat	50	141.96	1.0	7.10
NaCl	500	58.44	1.0	29.22
Imidazol	500	68.08	1.0	34.04

Dialyse für die inverse Ni-Säule (pH 8.0)

Chemikalien	c (mM)	MW (g/mol)	V (L)	m (g)
Dinatriumhydrogenphosphat	50	141.96	5	35.50
NaCl	100	58.44	5	29.22
DTT	5	154.20	5	3.86

IEX A für die MonoS (pH 7.0)

Chemikalien	c (mM)	MW (g/mol)	V (L)	m (g)
HEPES	50	238.31	1	11.92
NaCl	25	58.44	1	1.50
DTT	5	154.20	1	0.77

IEX B für die MonoS (pH 7.0)

Chemikalien	c (mM)	MW (g/mol)	V (L)	m (g)
HEPES	50	238.31	1	11.92
NaCl	500	58.44	1	29.22
DTT	5	154.20	1	0.77

Dialyse für die MonoS (pH 7.0)

Chemikalien	c (mM)	MW (g/mol)	V (L)	m (g)
HEPES	50	238.31	5	59.58
NaCl	2.5	58.44	5	0.73
DTT	5	154.20	5	3.86

8.2 Kristallisation und Strukturbestimmung

Für die Strukturbestimmungen wurden drei verschiedene Varianten von Proteinkristallen gezüchtet. Die Kristallisationsbedingungen unterscheiden sich innerhalb dieser Varianten nur geringfügig. Zunächst wurde ein LC- und ein MBT-Puffer hergestellt (vergleiche **Tabelle 8.4** und **Tabelle 8.5**).

Tabelle 8.4: Zusammensetzung der Lösungen für die Herstellung des LC- und MBT-Puffers.

MES-Puffer				
Substanz	M [g/mol]	m [g]	c_{End} [M]	V [mL]
MES	195.2	19.52	1	100
BIS-TRIS-Puffer				
Substanz	M [g/mol]	m [g]	c_{End} [M]	V [mL]
BIS-TRIS	209.2	20.92	1	100
DTT-Lösung				
Substanz	M [g/mol]	m [g]	c_{End} [M]	V [mL]
DTT	154.3	0.771	1	5
EDTA-Lösung pH 7				
Substanz	M [g/mol]	m [g]	c_{End} [M]	V [mL]
EDTA-Na ₂	372.2	0.372	0.1	10
Lithiumchlorid-Lösung				
Substanz	M [g/mol]	m [g]	c_{End} [M]	V [mL]
Lithiumchlorid	42.39	8.48	2	100

Der MBT-Puffer wurde durch die Zugabe von Bis-Tris-Puffer zu 10 mL MES-Puffer auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt.

Tabelle 8.5: Zusammensetzung des LC-Puffers mit 5 und 100 mM MBT.

Substanz	c [mol/L]	V [mL]
Lithiumchlorid-Lösung	2	3.75
MBT-Puffer	1	0.5 / 10
EDTA-Lösung pH 7	0.1	0.1
DTT-Lösung	1	0.1
demin. Wasser		ad 100 mL

Die Kristallisation und Bildung der Protein-Ligand-Komplexe erfolgten nach drei unterschiedlichen Ansätzen. Bei der ersten Variante wurden die Kristalle mit dem Peptid PKI (SIGMA ALDRICH, P7739) und dem jeweils zu untersuchenden Liganden kristallisiert. Für diese Kokristallisation jedes Liganden mit PKA und PKI mussten die Kristallisationsbedingungen einzeln angepasst werden. Dabei wurde die in **Tabelle 8.6** aufgeführte Kristallisationsbedingung als Grundlage verwendet. Das Ansetzen der Ligand-freien Kristalle (**Tabelle 8.7**) diente zur Erzeugung von Kristallen, mit welchen ein *Microseeding* durchgeführt werden konnte.

Tabelle 8.6: Zusammensetzung der Kristallisationslösung für die Kokristallisation.

Vormix		
Substanz	c_{Stock} [mM]	V [μL]
Protein in LC-Puffer	6-10 mg/mL	245
Mega 8	10	6.80
PKI	10	20.0
Endmix		
Substanz	c_{Stock} [mM]	V [μL]
Vormix	siehe oben	210
MBT-Puffer	1000	5.30
Ligand in DMSO	50 / 100	variiert

Tabelle 8.7: Zusammensetzung der Kristallisationslösung für PKI-haltige Kristalle.

Substanz	c_{Stock} [mM]	V [μL]
Protein in LC-Puffer	6-10 mg/mL	270
MBT-Puffer	1000	7.50
Mega 8	10	7.50
PKI	10	22.5

Die Proteinlösung wurde zunächst in einem LC-Puffer (**Tabelle 8.5**) umgepuffert und die in **Tabelle 8.6** aufgeführte Kristallisationsbedingung verwendet. Hierbei wurde der Ansatz des sitzenden Tropfens verwendet. Für diese Methode wurden 3 μL „Endmix“ in je eine Vertiefung einer Titerplatte pipettiert. Die Reservoirs wurden mit 500 mL eines Methanol-Wasser-Gemisches (18-24 % Methanol (v/v))

befüllt. Kristalle wurden nach 1-2 Wochen in einen *Crypuffer* (**Tabelle 8.8**) überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Tabelle 8.8: Pufferzusammensetzung mit Cryoschutz.

Substanz	Menge in % (v/v)
LC-Puffer	70 (abzüglich Methanol)
Methanol	18-24
MPD	30

Für die weiteren zwei Varianten der Kristallisation wurde zunächst kein Ligand in die Kristallisationslösung gegeben. Der Unterschied (**Tabelle 8.9**) liegt in der Verwendung oder auf dem Verzicht eines Peptids als Pseudosubstrat Inhibitor (PKI, SIGMA ALDRICH P7739). Die Kristallisation wurde unter denselben Bedingungen wie die erste Variante durchgeführt.

Tabelle 8.9: Zusammensetzung der Liganden-freien Kristalle mit und ohne PKI. Bei der Bedingung ohne PKI wird MBT zusätzlich zu dem im LC-Puffer enthaltenen MBT zugegeben. Die Angabe c_{End} bezieht sich auf die gesamte MBT-Menge.

Mit PKI		
Substanz	c _{Stock} [mM]	V [μL]
Protein in LC-Puffer	8 mg/mL	270
MBT-Puffer	1000	7.50
Mega 8	10	7.50
PKI	10	22.5
Ohne PKI		
Substanz	c _{Stock} [mM]	V [μL]
Protein in LC-Puffer	8 mg/mL	88.1
MBT-Puffer	100	9.5
Mega 8	10	2.4

Nach der Kristallisation der PKA mit den Varianten zwei (mit PKI) und drei (ohne PKI) werden die erhaltenen Kristalle in je einen Tropfen mit dem zu untersuchenden Liganden gebracht (*Soakingpuffer* siehe **Tabelle 8.10**).

Tabelle 8.10: Pufferzusammensetzung für Soaking-Experimente.

Substanz	Menge in % (v/v)
LC-Puffer/Methanol	60 (18-24% Methanol)
MPD	30
Ligand in DMSO (100 mM-1 M)	10

Dieser *Soakingpuffer* enthält MPD als Schutz vor Eiskristallbildung, sodass die Kristalle nach einer Zeit von 15 min bis zu 24 h in flüssigem Stickstoff eingefroren werden können. Die anschließende Vermessung der Kristalle ist für alle Varianten gleich. Eine Zusammenfassung der verwendeten Bedingungen ist für jede Protein-Ligand-Komplexstruktur in **Tabelle 8.11** aufgelistet.

Tabelle 8.11: Auflistung der Bedingungen für die Kristallisation der Protein-Ligand-Komplexe.

Ligand ID	Methode / Variante	c _{MBT} [mM]	c _{Ligand} [mM]
1, 5 ^[a]	<i>Soaking</i> / drei	100	100
7-12 ^[a]	<i>Soaking</i> / drei	100	100
14, 17, 19 ^[a]	<i>Soaking</i> / drei	100	100
21 ^[b]	<i>Soaking</i> / zwei	100	5
21 ^[b]	Kokristallisation / eins	100	5
27 ^[b]	<i>Soaking</i> / zwei	100	100
27 ^[b]	Kokristallisation / eins	100	14
29 ^[c,d]	<i>Soaking</i> / zwei	100	100
21 ^[d]	<i>Soaking</i> / zwei	100	5
33 ^[e]	Kokristallisation / eins	100	15
36 ^[e]	Kokristallisation / eins	5	14
39 ^[e]	Kokristallisation / eins	100	14
40 ^[e]	<i>Soaking</i> / drei	100	15
41-62 ^[f]	Kokristallisation / eins	100	10
67k ^[g]	Kokristallisation / eins	100	10
67s ^[g]	<i>Soaking</i> / drei	100	10
68k ^[g]	Kokristallisation / eins	100	10
68s ^[g]	<i>Soaking</i> / drei	100	10
72s ^[g]	<i>Soaking</i> / drei	100	10

^[a] Strukturen aus Kapitel 2.

^[b] Strukturen aus Kapitel 3.

^[c] Hierbei wurde zunächst **21** in einen Kristall *gesoakt* und anschließend durch **29** verdrängt.

^[d] Strukturen aus Kapitel 4.

^[e] Strukturen aus Kapitel 5.

^[f] Strukturen aus Kapitel 6.

^[g] Strukturen aus Kapitel 7.

Für die Strukturbestimmungen erfolgten Röntgenbeugungsexperimente an verschiedenen Synchrotron-Einrichtungen. Die Experimente sind am BESSY II Speicherring^[81] an den Strahllinien 14.1, 14.2, 14.3 und der P11 und P14 am DESY^[82,83], sowie an der ID23-2 am ESRF durchgeführt worden (Details siehe **Tabelle 9.1-Tabelle 9.7**).

Die Prozessierung der Daten und der molekulare Ersatz wurden mithilfe von XDS^[134] und CCP4 Phaser^[135] unter Verwendung einer PDB Struktur der CHO PKA (6F14) durchgeführt. Auf ein *Simulated Annealing* der Struktur in dem Programm Phenix^[136,137] folgte ein Zyklus aus Verfeinerung (Phenix) und Modellbau in Coot^[121]. Dieser Zyklus wurde bis zur Konvergenz des freien R-Wertes gegen einen Testsatz der erhaltenen Daten (5% der Gesamtreflexe) durchgeführt. Eine anisotrope Verfeinerung der B-Faktoren mit Ausnahme von Wassermolekülen erfolgte bei einer Verbesserung des freien R-Wertes um mindestens 0.5%. Andernfalls wurde eine TLS-Verfeinerung bei einer Senkung des freien R-Wertes um 0.5% oder eine isotrope Verfeinerung durchgeführt. Alle Atome konnten bezüglich ihrer Besetzung verfeinert werden. Seitenketten und alternative Konformationen wurden lediglich eingebaut, wenn diese mindestens zu 20% besetzt sind. Wassermoleküle wurden zu 100% oder mit alternativer Konformationen zu 50% besetzt eingebaut. Abweichende Besetzungen traten lediglich bei Korrelation von Wassermolekülen zu Liganden oder Aminosäuren des Proteins auf und wurden anhand der Besetzung letzterer festgelegt. Wasserstoffatome wurden dann mit Phenix hinzugefügt, wenn der freie R-Wert des Modells um mindestens 0.5% verbessert wurde. Es folgte ein Entfernen der Wasserstoffatome von allen Liganden des Modells und eine weitere Verfeinerung in Phenix.

Für die Validierung der Strukturen wurden Ramachandran Auftragungen mit PROCHECK^[138] erstellt und mittlere B-Faktoren mithilfe von Moleman^[139,140] aus den pdb-Dateien berechnet. Kristallographische Informations-Dateien (cif-Dateien) konnten für die untersuchten Liganden mithilfe von Mogul^[141,142] auf dem Grade Web Server^[143] erstellt werden. Die visuellen Darstellungen der Strukturen wurden mit Pymol^[113] realisiert.

9. Anhang

Im Folgenden werden die kristallographischen Tabellen und die in Kapitel 3 diskutierten RMSD-Werte aufgelistet. Weiterhin sind die ausgewerteten ITC-Thermogramme gezeigt.

9.1 Kristallographische Tabellen

Tabelle 9.1: Kristallographische Tabelle der Verbindungen 1 und 5-7.

Ligand (PDB-Code)	1 (6SNX)	5 (6Z44)	6 (5N33)	7 (6SPS)
Datensammlung und Prozessierung				
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	0.8655	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Parameter der Einheitszelle: a, b, c [Å]	51.8, 71.3, 97.2	51.8, 71.4, 97.4	58.2, 72.6, 108.8	51.7, 71.3, 97.5
Synchrotroneinrichtung (<i>Beamline</i>)	BESSY II (14.2)	BESSY II (14.2)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)
Detektor	DECTRIS PILATUS3S 2M	DECTRIS PILATUS3S 2M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M
Diffraktionsdaten^[a]				
Auflösungsbereich [Å]	45.67-1.40 (1.48-1.40)	48.71-1.38 (1.46-1.38)	50-1.43 (1.52-1.43)	45.65-1.65 (1.75-1.65)
Symmetrieunabhängige Reflexionen	70483 (11148)	74984 (11843)	84316 (12943)	43348 (6900)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	9.6 (45.0)	4.2 (49.7)	6.6 (52.6)	6.9 (49.5)
Vollständigkeit [%]	98.2 (97.7)	99.8 (98.9)	99.2 (95.3)	98.1 (97.9)
Redundanz	4.5	6.5	6.3	4.2
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8.5 (2.2)	21.7 (3.1)	14.9 (2.6)	12.7 (2.3)
Verfeinerung				
Auflösungsbereich [Å]	45.66-1.40	48.71-1.38	41.91-1.43	45.65-1.65
Genutzte Reflexionen (<i>work/free</i>)	66855/3519	71233/3750	80100/4216	41179/2168
Finaler R-Wert für alle Reflexionen (<i>work/free</i>) [%]	14.2/17.3	14.5/17.4	17.1/19.1	18.6/22.3
Aminosäuren (PKA/PKI)	340	338	351/13	338
Inhibitoratome	18	7	17	13
Wassermoleküle	293	258	323	254
RMSD – idealisierte Werte				
Bindungslängen [Å]	0.007	0.007	0.008	0.006
Bindungswinkel [°]	0.9	0.9	1	0.8
Ramachandran Auftragung [%]^[b]				
Favorisierte Regionen	92.1	91.7	92.8	90.4
Zusätzlich erlaubte Regionen	7.9	7.9	7.2	9.3
Tolerierbare Regionen	0.0	0.3	0.0	0.3
Mittlere B-Faktoren [Å²]^[c]				
Protein/Peptid	18.0	19.6	24.5/29.2	24.0
Inhibitor	29.4	28.9	20.1	29.7
Wassermoleküle	25.1	20.0	33.7	29.2
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da) ^[d]	2.2	2.2	2.8	2.2
Lösungsmittelgehalt [%] ^[d]	43.7	44.0	57.0	43.8

[a] Die Werte in runden Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Diese Werte wurden mit PROCHECK ermittelt.^[138]

[c] Diese Werte wurden mit MOLEMAN bestimmt.^[139,140] Die Wasserstoffatome wurden von der Berechnung ausgenommen.

[d] Diese Werte wurden mithilfe von Ruppweb bestimmt.^[144]

Tabelle 9.2: Kristallographische Tabelle der Verbindungen 8-11.

Ligand (PDB-Code)	8 (6SPY)	9 (6SOX)	10 (6SNN)	11 (6SPM)
Datensammlung und Prozessierung				
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	0.9184	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Parameter der Einheitszelle: a, b, c [Å]	51.5, 71.3, 97.5	51.7, 71.4, 97.8	52.3, 71.5, 98.5	51.6, 71.4, 97.8
Synchrotroneinrichtung (<i>Beamline</i>)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)
Detektor	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M
Diffraktionsdaten^[a]				
Auflösungsbereich [Å]	48.75-1.60 (1.70-1.60)	45.70-1.38 (1.46-1.38)	46.17-1.82 (1.93-1.82)	45.61-1.37 (1.45-1.37)
Symmetrieunabhängige Reflexionen	47330 (7445)	74638 (11910)	33571 (5195)	76337 (12112)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	6.7 (48.4)	5.0 (48.2)	5.7 (50.0)	4.8 (48.5)
Vollständigkeit [%]	98.2 (97.1)	99.2 (99.2)	98.8 (95.9)	99.5 (99.0)
Redundanz	4.5	4.4	5.8	4.4
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	12.4 (2.4)	16.0 (2.7)	20.9 (3.2)	16.8 (2.7)
Verfeinerung				
Auflösungsbereich [Å]	48.75-1.60	45.70-1.38	46.17-1.82	38.44-1.37
Genutzte Reflexionen (<i>work/free</i>)	44963/2367	70906/3732	31892/1679	72520/3817
Finaler R-Wert für alle Reflexionen (<i>work/free</i>) [%]	16.0/18.2	14.6/16.8	17.3/20.9	14.6/17.0
Aminosäuren (PKA/PKI)	338	338	339	338
Inhibitoratome	15	12	18	13
Wassermoleküle	308	309	236	313
RMSD – idealisierte Werte				
Bindungslängen [Å]	0.008	0.007	0.007	0.007
Bindungswinkel [°]	1.0	1.0	0.8	0.9
Ramachandran Auftragung [%]^[b]				
Favorisierte Regionen	91.1	91.4	92.4	90.7
Zusätzlich erlaubte Regionen	8.9	8.3	7.6	9.3
Tolerierbare Regionen	0.0	0.3	0.0	0.0
Mittlere B-Faktoren [Å²]^[c]				
Protein/Peptid	21.8	16.0	24.3	16.0
Inhibitor	21.3	23.6	22.4	17.5
Wassermoleküle	31.0	26.0	32.5	27.0
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da) ^[d]	2.2	2.2	2.2	2.2
Lösungsmittelgehalt [%] ^[d]	43.7	44.1	45.2	44.0

[a] Die Werte in runden Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Diese Werte wurden mit PROCHECK ermittelt.^[138]

[c] Diese Werte wurden mit MOLEMAN bestimmt.^[139,140] Die Wasserstoffatome wurden von der Berechnung ausgenommen.

[d] Diese Werte wurden mithilfe von Ruppweb bestimmt.^[144]

Tabelle 9.3: Kristallographische Tabelle der Verbindungen 12, 14, 17 und 19.

Ligand (PDB-Code)	12 (6SPU)	14 (6Z08)	17 (6YPS)	19 (6ZN0)
Datensammlung und Prozessierung				
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	0.9184	0.9184	1.0332	0.9184
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Parameter der Einheitszelle: a, b, c [Å]	51.5, 71.6, 97.7	51.7, 71.3, 97.2	51.7, 71.3, 97.5	51.7, 71.2, 97.5
Synchrotroneinrichtung (<i>Beamline</i>)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	DESY (P11)	BESSY II (14.2)
Detektor	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3S 2M
Diffraktionsdaten^[a]				
Auflösungsbereich [Å]	45.55-1.39 (1.47-1.39)	45.61-1.49 (1.58-1.49)	48.75-1.35 (1.43-1.35)	45.70-1.59 (1.68-1.59)
Symmetrieunabhängige Reflexionen	73002 (11715)	58203 (9369)	78185 (12184)	49029 (7675)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	6.5 (48.1)	3.8 (50.2)	4.2 (52.9)	7.4 (49.0)
Vollständigkeit [%]	99.3 (99.5)	98.0 (99.0)	97.5 (95.1)	99.2 (97.3)
Redundanz	4.4	4.4	7.3	6.8
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.7 (2.3)	23.0 (2.9)	22.6 (3.5)	16.4 (4.2)
Verfeinerung				
Auflösungsbereich [Å]	45.55-1.39	45.61-1.49	48.75-1.35	45.70-1.59
Genutzte Reflexionen (<i>work/free</i>)	69351/3651	55292/2911	74275/3910	46577/2452
Finaler R-Wert für alle Reflexionen (<i>work/free</i>) [%]	16.4/18.4	16.1/18.5	14.4/15.7	15.5/18.6
Aminosäuren (PKA/PKI)	338	338	338	338
Inhibitoratome	17	10	10	9/9
Wassermoleküle	286	276	236	273
RMSD – idealisierte Werte				
Bindungslängen [Å]	0.008	0.008	0.008	0.005
Bindungswinkel [°]	1.0	1.0	0.9	0.7
Ramachandran Auftragung [%]^[b]				
Favorisierte Regionen	92.4	92.4	91.4	91.7
Zusätzlich erlaubte Regionen	7.3	7.6	8.6	8.3
Tolerierbare Regionen	0.3	0.0	0.0	0.0
Mittlere B-Faktoren [Å²]^[c]				
Protein/Peptid	18.9	20.6	20.7	17.8
Inhibitor	13.2	28.3	26.9	19.6/29.0
Wassermoleküle	28.3	30.8	31.2	28.1
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da) ^[d]	2.2	2.2	2.2	2.2
Lösungsmittelgehalt [%] ^[d]	44.0	43.6	43.9	43.8

[a] Die Werte in runden Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Diese Werte wurden mit PROCHECK ermittelt.^[138]

[c] Diese Werte wurden mit MOLEMAN bestimmt.^[139,140] Die Wasserstoffatome wurden von der Berechnung ausgenommen.

[d] Diese Werte wurden mithilfe von Ruppweb bestimmt.^[144]

Tabelle 9.4: Kristallographische Tabelle der Verbindungen 21, 27 und 29.

Ligand (PDB-Code)	21 (6YNT) <i>Soaking, mit PKI</i>	27 (6YNR) <i>Soaking, mit PKI</i>	27 (6Y2O) Kokristallisiert	29 (6YPP) Kapitel 4
Datensammlung und Prozessierung				
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	0.9184	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Parameter der Einheitszelle: a, b, c [Å]	72.5, 74.5, 80.4	72.4, 74.3, 80.2	58.6, 74.9, 106.0	52.5, 71.7, 97.8
Synchrotroneinrichtung (<i>Beamline</i>)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)
Detektor	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M
Diffraktionsdaten ^[a]				
Auflösungsbereich [Å]	43.63-1.52 (1.61-1.52)	43.54-1.90 (2.01-1.90)	46.18-2.01 (2.13-2.01)	48.89-1.75 (1.85-1.75)
Symmetrieunabhängige Reflexionen	67316 (10749)	34602 (5482)	31850 (5005)	37708 (5905)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	4.4 (44.0)	5.6 (49.6)	5.4 (48.9)	4.7 (51.5)
Vollständigkeit [%]	99.5 (99.6)	99.2 (98.4)	99.5 (98.4)	98.9 (97.6)
Redundanz	4.4	4.4	5.9	4.2
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	17.1 (3.0)	18.8 (3.0)	19.9 (3.6)	20.7 (2.6)
Verfeinerung				
Auflösungsbereich [Å]	43.63-1.52	43.54-1.90	46.18-2.01	48.89-1.75
Genutzte Reflexionen (<i>work/free</i>)	63950/3366	32867/1730	30254/1593	37708/1886
Finaler R-Wert für alle Reflexionen (<i>work/free</i>) [%]	16.9/19.1	18.8/22.1	22.1/25.4	17.7/20.3
Aminosäuren (PKA/PKI)	346/19	341/19	353/18	337/16
Inhibitoratome	21	11	11	10
Wassermoleküle	276	216	137	187
RMSD – idealisierte Werte				
Bindungslängen [Å]	0.008	0.006	0.007	0.009
Bindungswinkel [°]	1.0	0.7	0.8	0.9
Ramachandran Auftragung [%] ^[b]				
Favorisierte Regionen	91.3	92.1	92.4	92.0
Zusätzlich erlaubte Regionen	8.7	7.6	7.6	8.0
Tolerierbare Regionen	0.0	0.3	0.0	0.0
Mittlere B-Faktoren [Å²] ^[c]				
Protein/Peptid	26.4/24.1	26.6/24.2	37.7/37.9	25.3/34.3
Inhibitor	30.4	25.1	35.3	22.3
Wassermoleküle	33.1	30.8	38.5	32.3
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da) ^[d]	2.8	2.6	2.8	2.2
Lösungsmittelgehalt [%] ^[d]	56.1	53.3	56.7	45.1

[a] Die Werte in runden Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Diese Werte wurden mit PROCHECK ermittelt.^[138][c] Diese Werte wurden mit MOLEMAN bestimmt.^[139,140] Die Wasserstoffatome wurden von der Berechnung ausgenommen.[d] Diese Werte wurden mithilfe von Ruppweb bestimmt.^[144]

Tabelle 9.5: Kristallographische Tabelle der Verbindungen 33-36.

Ligand (PDB-Code)	33 (6YOT)	34 (7AXV)	35 (7AXT)	36 (6Y89)
Datensammlung und Prozessierung				
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	0.9184	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Parameter der Einheitszelle: a, b, c [Å]	57.9, 72.6, 107.6	58.3, 73.1, 109.0	58.5, 73.3, 109.5	64.1, 79.0, 88.4
Synchrotroneinrichtung (<i>Beamline</i>)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)
Detektor	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M
Diffraktionsdaten^[a]				
Auflösungsbereich [Å]	45.23-1.96 (2.08-1.96)	45.86-1.79 (1.89-1.79)	45.69-1.86 (2.00-1.86)	44.19-1.56 (1.65-1.56)
Symmetrieunabhängige Reflexionen	32669 (5037)	44782 (7059)	39203 (5792)	64253 (10188)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	6.6 (51.4)	5.0 (52.4)	9.3 (49.6)	6.9 (49.0)
Vollständigkeit [%]	98.3 (95.3)	98.0 (96.9)	98.0 (94.0)	99.4 (99.0)
Redundanz	4.1	4.3	6.2	4.8
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13.9 (2.2)	17.9 (2.5)	12.8 (2.6)	13.4 (2.6)
Verfeinerung				
Auflösungsbereich [Å]	45.23-1.96	45.86-1.79	45.69-1.86	44.19-1.56
Genutzte Reflexionen (<i>work/free</i>)	31035/1634	42542/2240	37242/1961	61040/3213
Finaler R-Wert für alle Reflexionen (<i>work/free</i>) [%]	19.1/21.3	19.8/23.2	18.7/22.7	16.8/19.2
Aminosäuren (PKA/PKI)	353/19	346/20	344/18	338/19
Inhibitoratome	16/16	14/14	13	14
Wassermoleküle	187	245	179	372
RMSD – idealisierte Werte				
Bindungslängen [Å]	0.006	0.008	0.010	0.006
Bindungswinkel [°]	0.8	0.8	1.0	0.8
Ramachandran Auftragung [%]^[b]				
Favorisierte Regionen	91.7	92.4	91.5	92.0
Zusätzlich erlaubte Regionen	8.3	7.3	7.5	8.0
Tolerierbare Regionen	0.0	0.0	1.0	0.0
Mittlere B-Faktoren [Å²]^[c]				
Protein	33.8/31.8	32.7/29.1	32.8/31.0	18.3/18.2
Inhibitor	28.5	40.5/31.9	33.0	17.8
Wassermoleküle	35.8	34.7	31.3	28.0
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da) ^[d]	2.8	2.8	2.9	2.7
Lösungsmittelgehalt [%] ^[d]	55.4	56.6	56.9	54.9

[a] Die Werte in runden Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Diese Werte wurden mit PROCHECK ermittelt.^[138]

[c] Diese Werte wurden mit MOLEMAN bestimmt.^[139,140] Die Wasserstoffatome wurden von der Berechnung ausgenommen.

[d] Diese Werte wurden mithilfe von Ruppweb bestimmt.^[144]

Tabelle 9.6: Kristallographische Tabelle der Verbindungen 37, 39, 46 und 67k.

Ligand (PDB-Code)	37 (7AXW)	39 (6YOU)	46 (7BB0)	67k (7BAQ)
Datensammlung und Prozessierung				
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	0.9184	0.9184	0.9184	0.9184
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Parameter der Einheitszelle: a, b, c [Å]	73.0, 107.5, 58.0	51.9, 71.4, 97.4	58.8, 73.4, 110.9	69.2, 73.3, 77.4
Synchrotroneinrichtung (<i>Beamline</i>)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)
Detektor	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M
Diffraktionsdaten^[a]				
Auflösungsbereich [Å]	45.48-1.69 (1.79-1.69)	45.81-1.73 (1.83-1.73)	44.24-1.75 (1.85-1.75)	42.20-1.54 (1.63-1.54)
Symmetrieunabhängige Reflexionen	48217 (6544)	37845 (5976)	48020 (7545)	58308 (9403)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	5.1 (44.8)	6.3 (49.0)	4.5 (50.0)	3.5 (48.4)
Vollständigkeit [%]	92.6 (78.9)	98.1 (97.6)	97.1 (95.6)	98.8 (99.6)
Redundanz	5.1	4.4	4.3	4.4
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19.3 (2.6)	14.9 (2.7)	15.6 (2.4)	18.1 (2.3)
Verfeinerung				
Auflösungsbereich [Å]	45.48-1.69	45.81-1.73	35.34-1.75	33.14-1.54
Genutzte Reflexionen (<i>work/free</i>)	45806/2411	35950/1893	45619/2401	55410/2898
Finaler R-Wert für alle Reflexionen (<i>work/free</i>) [%]	18.1/21.9	17.9/21.6	20.1/23.5	17.6/22.0
Aminosäuren (PKA/PKI)	351/18	338	349/18	340/18
Inhibitoratome	11	11	30	23
Wassermoleküle	295	233	144	194
RMSD – idealisierte Werte				
Bindungslängen [Å]	0.009	0.006	0.007	0.008
Bindungswinkel [°]	1.0	0.8	0.8	0.9
Ramachandran Auftragung [%]^[b]				
Favorisierte Regionen	92.0	93.0	90.3	90.8
Zusätzlich erlaubte Regionen	8.0	7.0	9.1	9.2
Tolerierbare Regionen	0.0	0.0	0.6	0.0
Mittlere B-Faktoren [Å²]^[c]				
Protein	28.5/24.7	22.2	40.3/34.1	33.1/36.1
Inhibitor	22.4	23.9	41.5	30.3
Wassermoleküle	31.6	31.0	40.2	38.7
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da) ^[d]	2.8	2.2	2.9	2.4
Lösungsmittelgehalt [%] ^[d]	55.6	44.1	57.8	48.6

[a] Die Werte in runden Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Diese Werte wurden mit PROCHECK ermittelt.^[138]

[c] Diese Werte wurden mit MOLEMAN bestimmt.^[139,140] Die Wasserstoffatome wurden von der Berechnung ausgenommen.

[d] Diese Werte wurden mithilfe von Ruppweb bestimmt.^[144]

Tabelle 9.7: Kristallographische Tabelle der Verbindungen 67s, 68k, 68s und 72s.

Ligand (PDB-Code)	67s (nicht deponiert)	68k (nicht deponiert)	68s (nicht deponiert)	72s (7BAR)
Datensammlung und Prozessierung				
Anzahl genutzter Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	0.9763	0.9184	0.9184	0.8266
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Parameter der Einheitszelle: a, b, c [Å]	51.8, 72.0, 97.6	68.5, 72.8, 76.6	51.9, 71.9, 97.4	51.8, 71.8, 97.3
Synchrotroneinrichtung (<i>Beamline</i>)	DESY (P14)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.1)	BESSY II (14.2)
Detektor	EIGER 16M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3 6M	DECTRIS PILATUS3S 2M
Diffraktionsdaten^[a]				
Auflösungsbereich [Å]	48.81-1.49 (1.58-1.49)	41.81-1.99 (2.11-1.99)	45.78-1.39 (1.47-1.39)	45.71-1.37 (1.45-1.37)
Symmetrieunabhängige Reflexionen	60442 (9564)	26055 (4164)	72935 (11570)	76558 (12286)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	5.2 (43.3)	8.1 (47.6)	4.3 (48.1)	3.4 (46.8)
Vollständigkeit [%]	99.8 (98.9)	96.1 (96.8)	98.5 (97.7)	99.5 (99.1)
Redundanz	13.0	4.4	4.4	4.4
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	26.6 (5.4)	10.6 (2.4)	17.2 (2.9)	21.2 (2.7)
Verfeinerung				
Auflösungsbereich [Å]	48.81-1.49	33.44-1.99	45.78-1.39	45.71-1.37
Genutzte Reflexionen (<i>work/free</i>)	57419/3023	24751/1303	69288/3647	72732/3826
Finaler R-Wert für alle Reflexionen (<i>work/free</i>) [%]	15.8/18.4	21.5/25.3	15.9/18.9	15.2/17.9
Aminosäuren (PKA/PKI)	338	336/20	338	338
Inhibitoratome	23/23	23/23	23/23	23/23
Wassermoleküle	250	83	295	274
RMSE – idealisierte Werte				
Bindungslängen [Å]	0.005	0.007	0.005	0.007
Bindungswinkel [°]	0.7	0.8	0.8	0.9
Ramachandran Auftragung [%]^[b]				
Favorisierte Regionen	93.0	90.7	92.4	92.4
Zusätzlich erlaubte Regionen	7.0	9.0	7.6	7.6
Tolerierbare Regionen	0.0	0.3	0.0	0.0
Mittlere B-Faktoren [Å²]^[c]				
Protein	22.2	30.3/32.4	19.7	19.8
Inhibitor	25.6	30.9	20.0	21.7
Wassermoleküle	32.4	31.1	30.1	29.1
Matthews Koeffizient (Å ³ /Da) ^[d]	2.2	2.3	2.2	2.2
Lösungsmittelgehalt [%] ^[d]	44.5	47.2	44.4	44.2

[a] Die Werte in runden Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

[b] Diese Werte wurden mit PROCHECK ermittelt.^[138][c] Diese Werte wurden mit MOLEMAN bestimmt.^[139,140] Die Wasserstoffatome wurden von der Berechnung ausgenommen.[d] Diese Werte wurden mithilfe von Ruppweb bestimmt.^[144]

9.2 Elektronendichte der Liganden

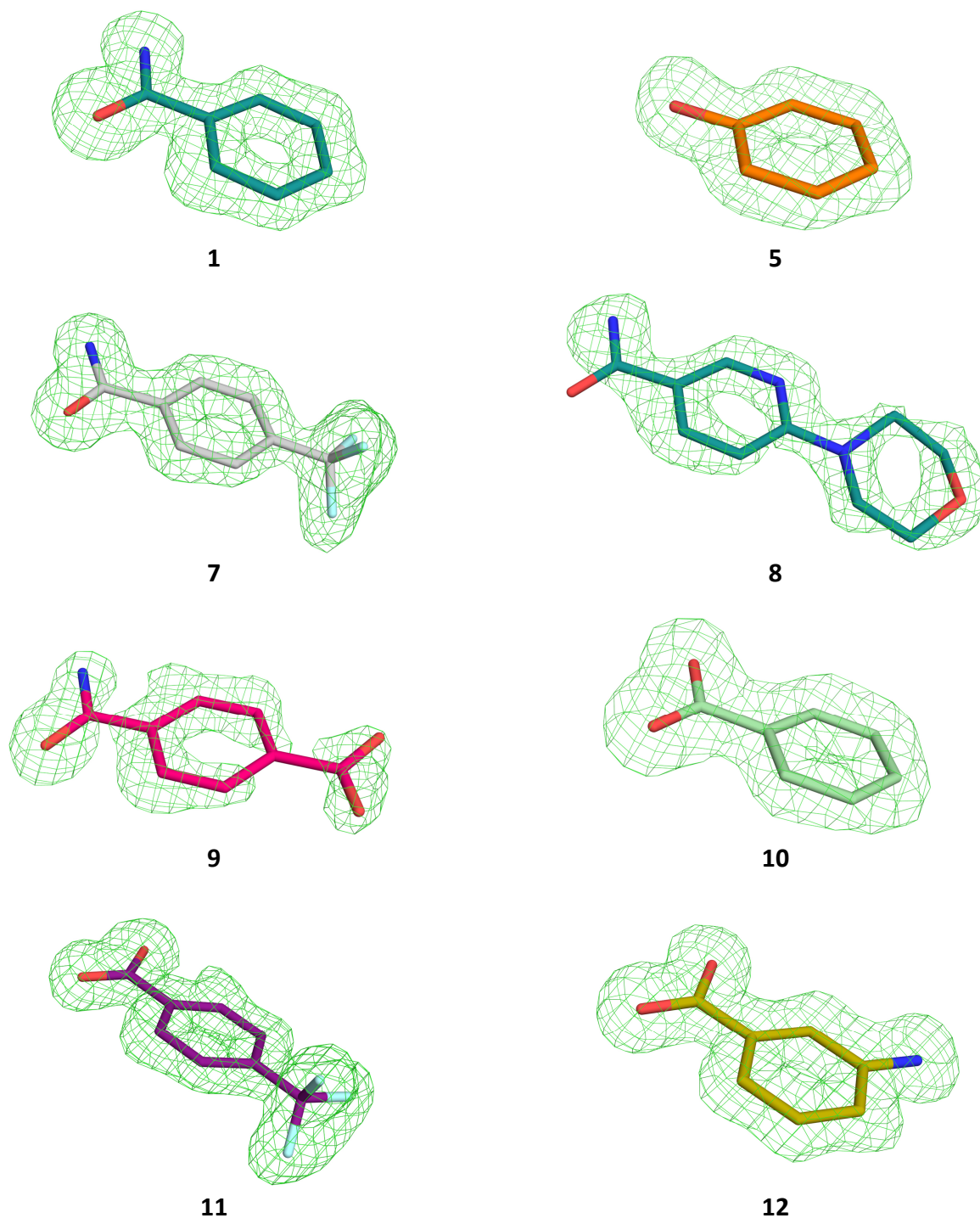


Abbildung 9.1: Elektronendichte der untersuchten Liganden (Abbildung 1 von 6). Dargestellt ist die $m|Fo|-|Fc|$ Differenzdichte (3σ) vor dem Einbau. Hier sind lediglich die Liganden gezeigt, welche in der ATP-Bindetasche gebunden haben.

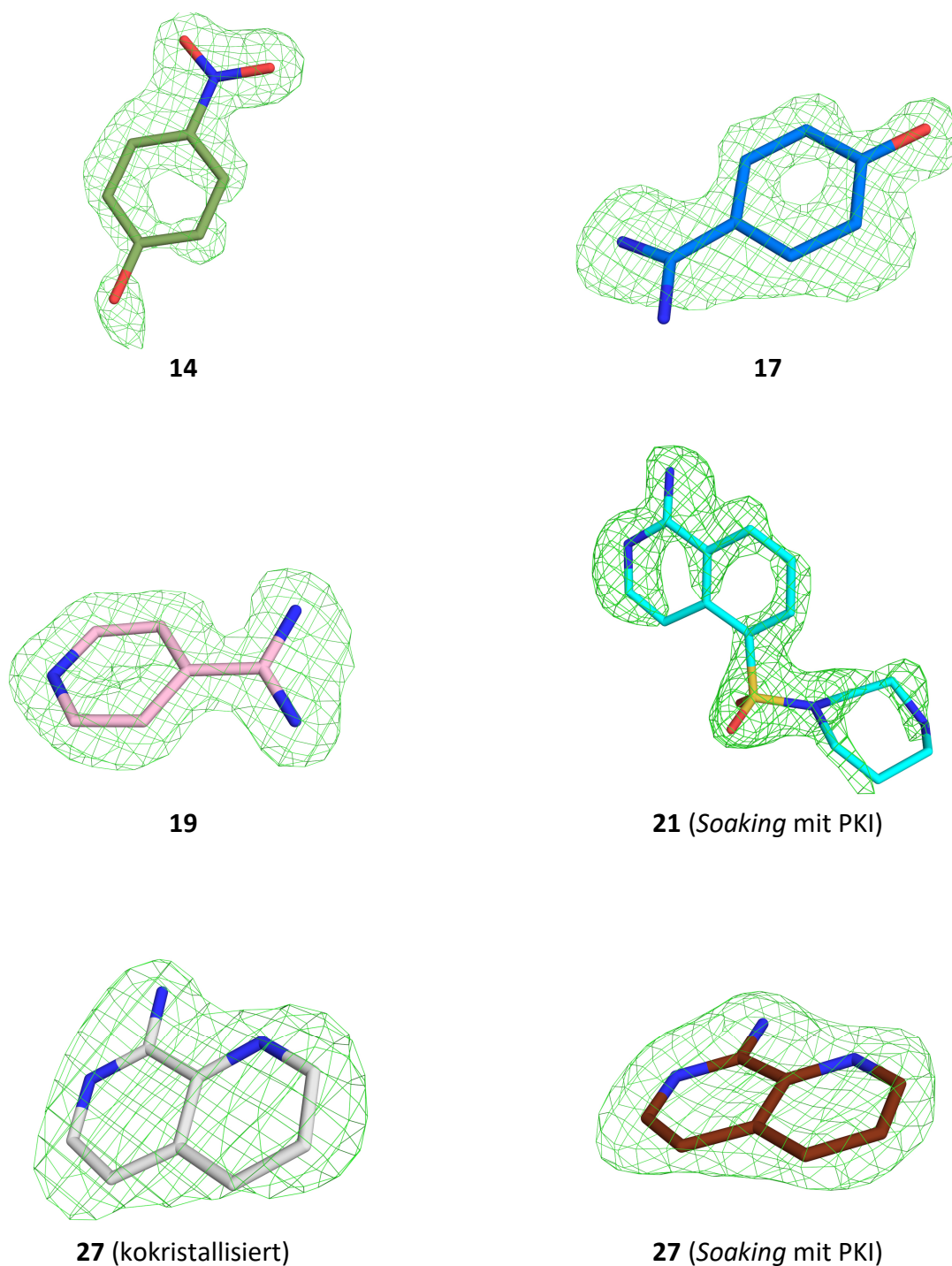
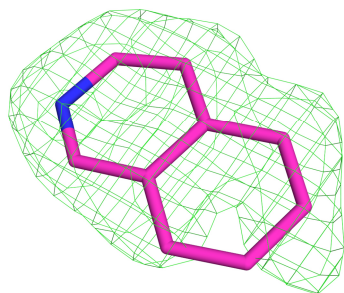
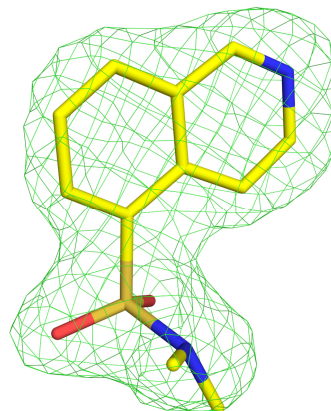


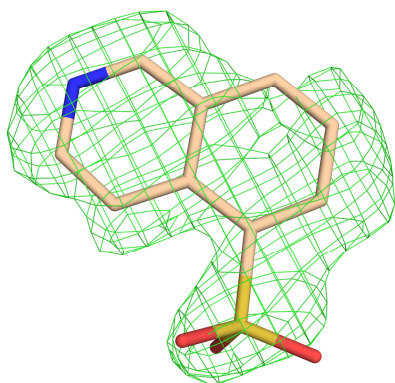
Abbildung 9.2: Elektronendichte der untersuchten Liganden (Abbildung 2 von 6). Dargestellt ist die $m|Fo| - |Fc|$ Differenzdichte (3σ) vor dem Einbau. Hier sind lediglich die Liganden gezeigt, welche in der ATP-Bindetasche gebunden haben.



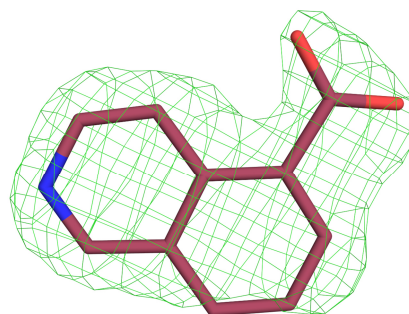
29 (Verdrängung von **21**)



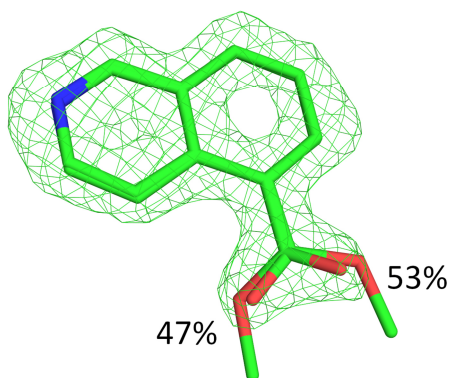
33



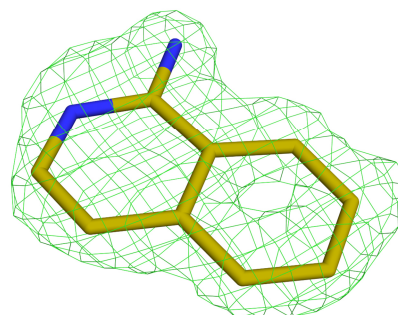
34



35



36



37

Abbildung 9.3: Elektronendichte der untersuchten Liganden (Abbildung 3 von 6). Dargestellt ist die $m|F_o|-|F_c|$ Differenzdichte (3σ) vor dem Einbau. Hier sind lediglich die Liganden gezeigt, welche in der ATP-Bindetasche gebunden haben.

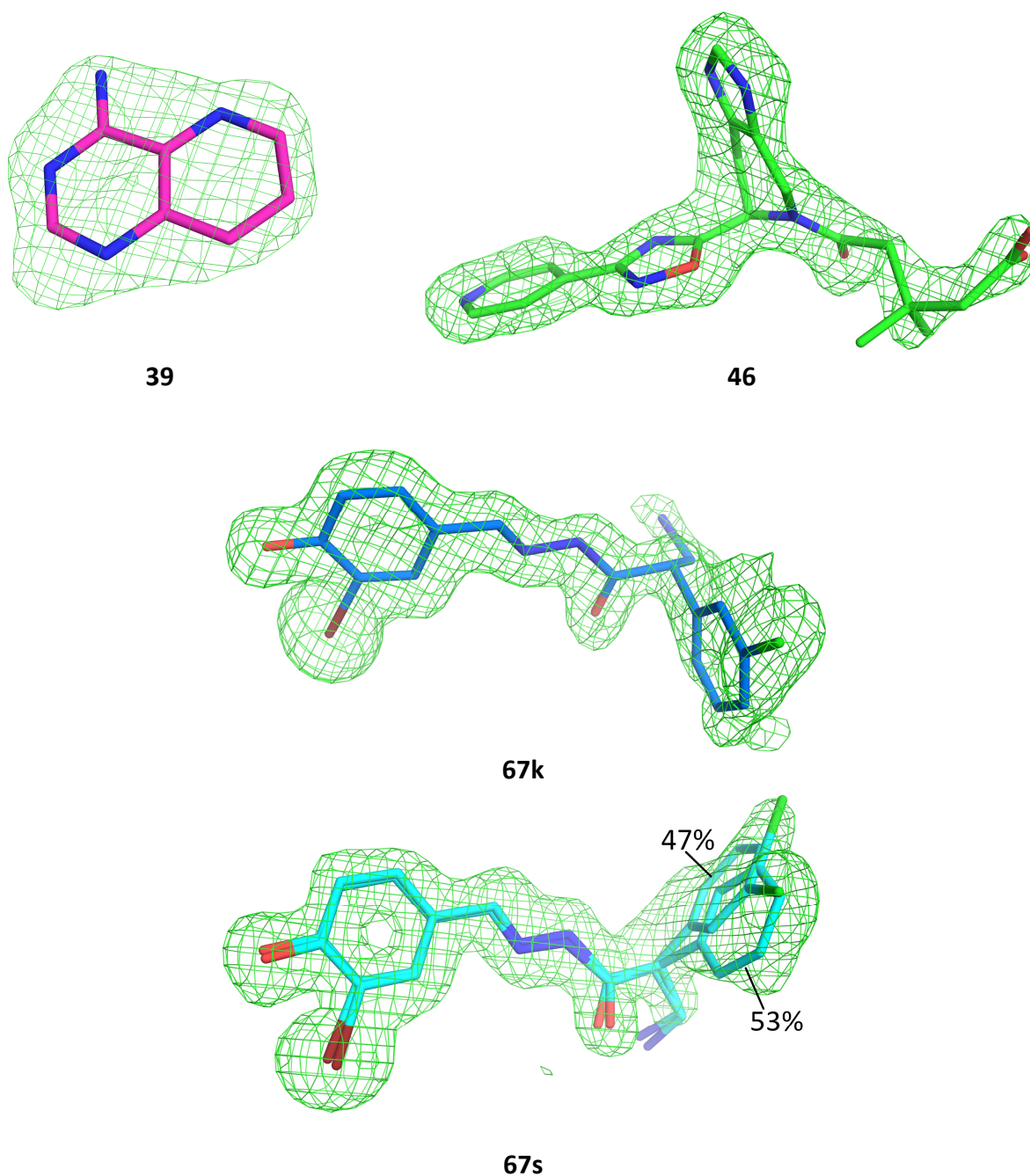
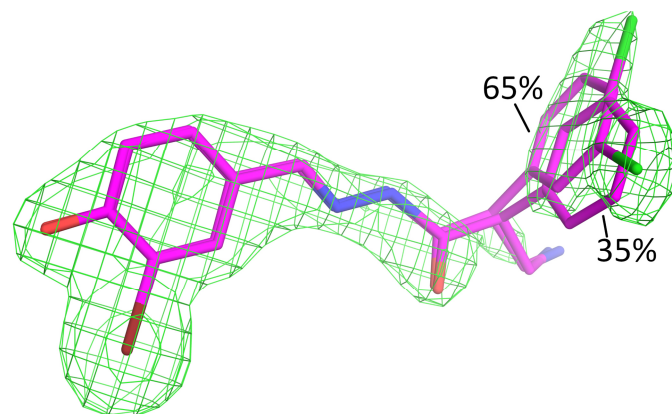
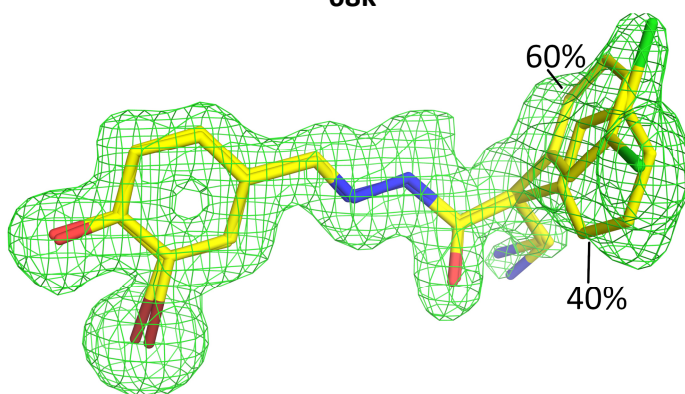


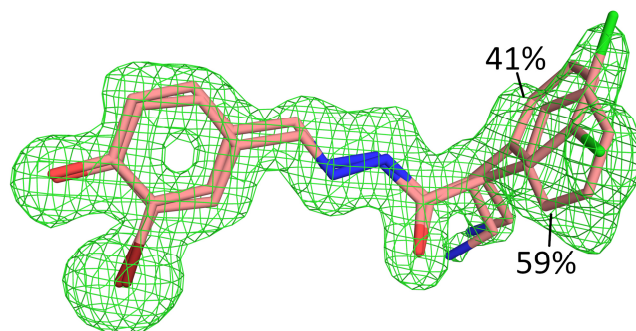
Abbildung 9.4: Elektronendichte der untersuchten Liganden (Abbildung 4 von 6). Dargestellt ist die $m|Fo| - |Fc|$ Differenzdichte (3σ) vor dem Einbau. Hier sind die Liganden gezeigt, welche in der ATP-Bindetasche gebunden haben.



68k



68s



72s

Abbildung 9.5: Elektronendichte der untersuchten Liganden (Abbildung 5 von 6). Dargestellt ist die $m|Fo|-|Fc|$ Differenzdichte (3σ) vor dem Einbau. Hier sind die Liganden gezeigt, welche in der ATP-Bindetasche gebunden haben.

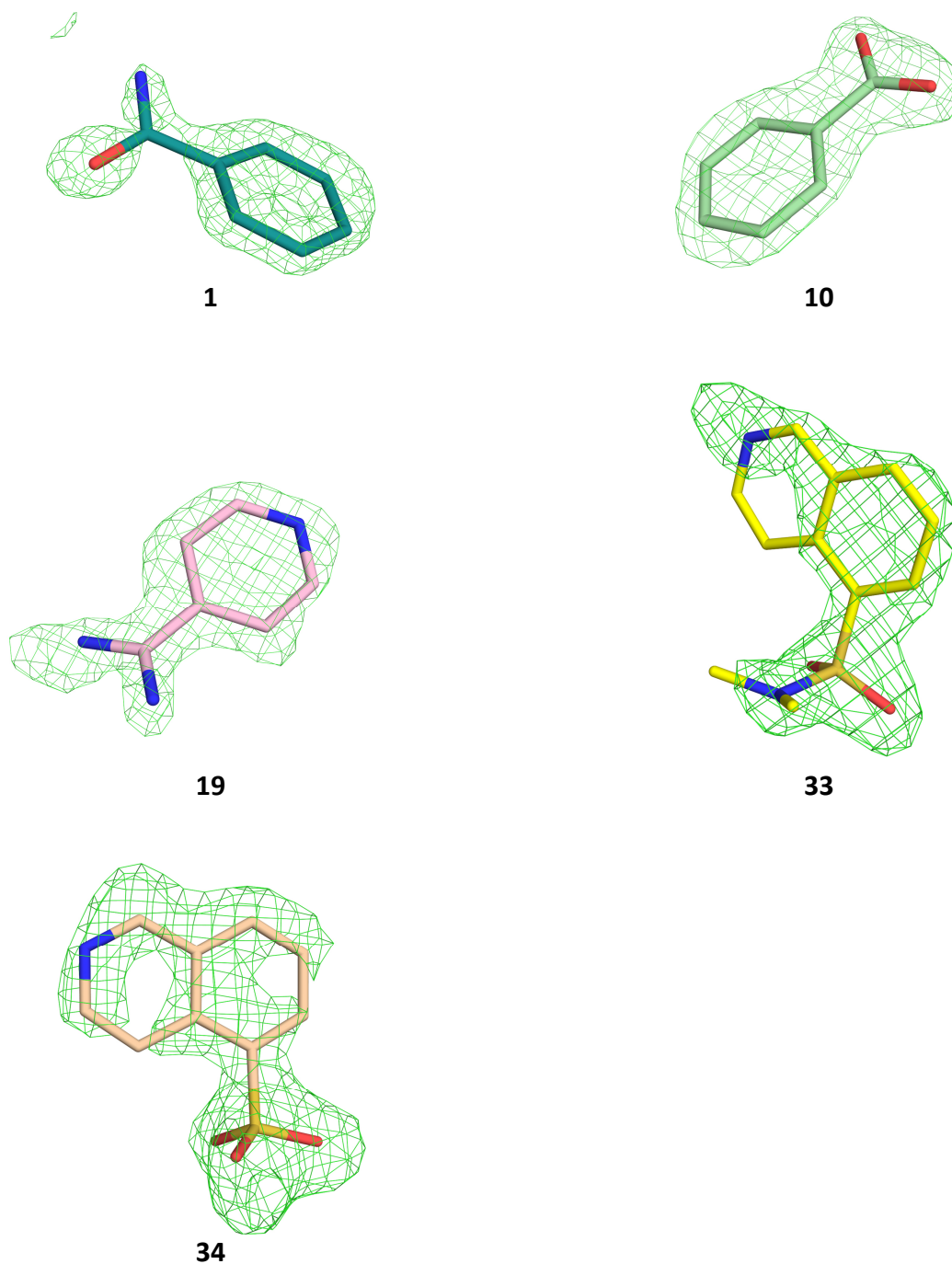


Abbildung 9.6: Elektronendichte der untersuchten Liganden (Abbildung 6 von 6). Dargestellt ist die $m|Fo|-|Fc|$ Differenzdichte (3σ) vor dem Einbau. Hier sind ausschließlich die Liganden gezeigt, welche nicht in der ATP-Bindetasche, aber an einer anderen Stelle des Proteins gebunden haben.

9.3 RMSD-Werte

Tabelle 9.8: RMSD-Vergleich der kokristallisierten Strukturen mit den Strukturen, die nach dem Soaking-Verfahren erhalten wurden.

Ligand	RMSD C _α [Å]	RMSD C _α Hinge (Met120-Val123) [Å]	RMSD Ligand [Å]	ΔRMSD (Ligand-Hinge) [Å]
20	1.03	0.49	0.97	0.47
21 (1. Ligand)	0.81	0.41	0.69	0.28
21 (2. Ligand)	0.81	0.41	0.62	0.21
22	0.66	0.29	0.67	0.38
23	1.02	0.42	0.94	0.53
24	0.70	0.37	0.89	0.52
25	0.66	0.31	1.24	0.93
26	0.46	0.20	0.17	0.03
27	0.37	0.21	0.13	0.09

Tabelle 9.9: RMSD-Vergleich aller Strukturen unter Verwendung von zwei Modellen, eins für die Kokristallstrukturen und eins für die nach dem Soaking erhaltenen Strukturen. Die Strukturen wurden mit dem Befehl "MULTREF" bearbeitet, um je eine gemittelte Struktur als Modell zu erhalten. Ein Vergleich dieses Modells mit jeder einzelnen Struktur ergibt die aufgelisteten Abweichungen.

Ligand	Kokristallisation RMSD C _α [Å]	Soaking RMSD C _α [Å]
20	0.50	0.17
21	0.44	0.34
22	0.46	0.43
23	0.47	0.24
24	0.27	0.23
25	0.27	0.21
26	0.51	0.22
27	0.49	0.33

9.4 Thermodynamische Daten

Tabelle 9.10: Auflistung der thermodynamischen Parameter für die Komplexbildung von 21 mit der PKA. Die Bestimmung erfolgte mithilfe der ITC nach drei direkten Titrationsen von 21 in einen PKA enthaltenen TRIS-Puffer.

	K_D [μM]	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]
1. Messung	0.8	-34.8	-36.6	1.7
2. Messung	0.8	-34.9	-36.6	1.7
3. Messung	0.8	-34.9	-37.1	2.2
Mittelwert	0.8 ± 0.0	-34.9 ± 0.0	-36.7 ± 0.3	1.9 ± 0.3

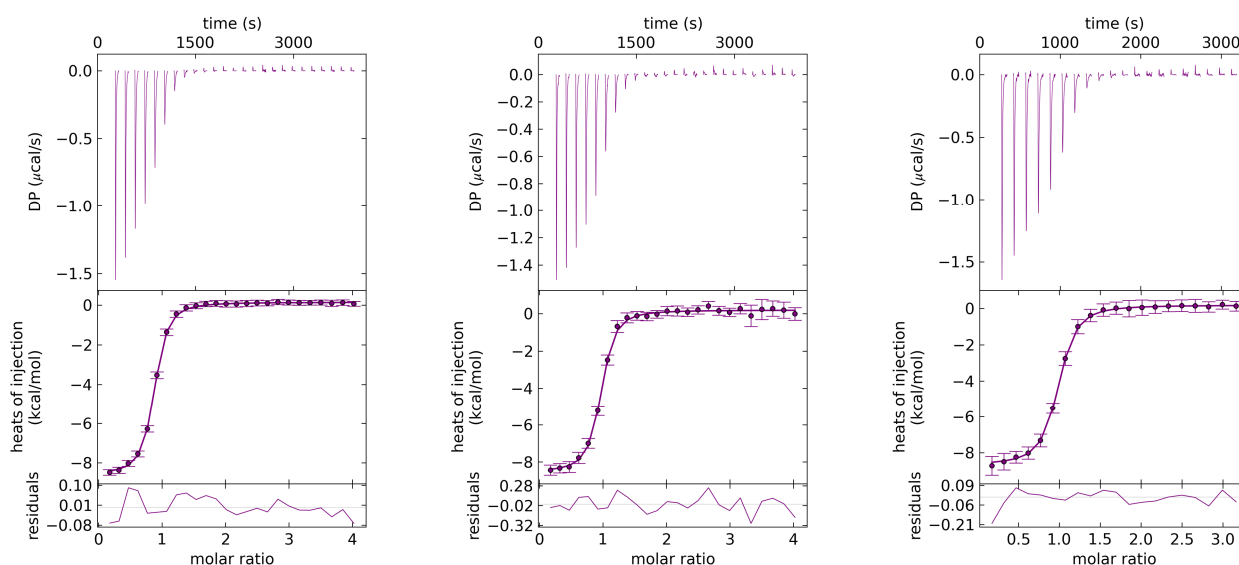


Abbildung 9.7: ITC-Ergebnisse der direkten Titration des Liganden 21 in einen TRIS-Puffer mit PKA. Gezeigt sind die Thermogramme und die Auftragungen der integrierten Wärmesignale gegen das stöchiometrische Verhältnis von Ligand zu Protein.

Tabelle 9.11: Auflistung der thermodynamischen Parameter für die Komplexbildung von 33 mit der PKA. Die Bestimmung erfolgte mithilfe der ITC nach drei direkten Titrationsen von 33 in einen PKA enthaltenen HEPES-Puffer.

	K_D [μM]	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]
1. Messung	13.5	-27.8	-36.3	8.5
2. Messung	10.5	-28.5	-33.2	4.7
3. Messung	13.8	-27.8	-36.5	8.8
Mittelwert	12.6 ± 1.8	-28.0 ± 0.4	-35.3 ± 1.9	7.3 ± 2.3

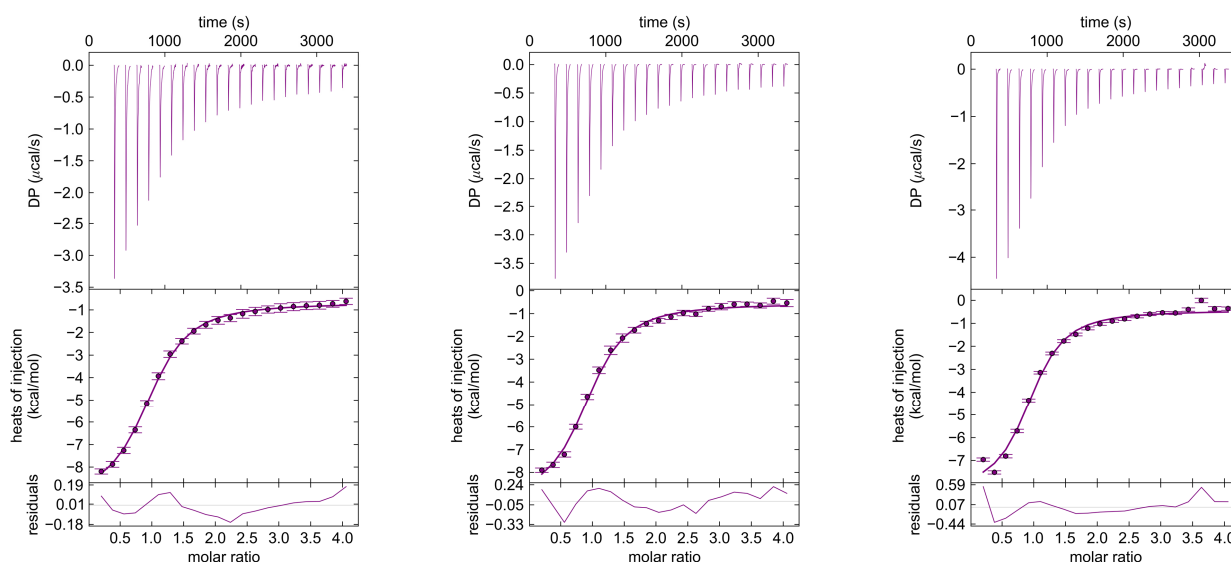


Abbildung 9.8: ITC-Ergebnisse der direkten Titration des Liganden 33 in einen HEPES-Puffer mit PKA. Gezeigt sind die Thermogramme und die Auftragungen der integrierten Wärmesignale gegen das stöchiometrische Verhältnis von Ligand zu Protein.

Tabelle 9.12: Auflistung der thermodynamischen Parameter für die Komplexbildung von 35 mit der PKA. Die Bestimmung erfolgte mithilfe der ITC nach einer Verdrängungstitration von **21** in einen PKA enthaltenen TRIS-Puffer. Das Protein wurde zuvor mit dem zu untersuchenden Liganden **35** gesättigt.

	K_D [μM]	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]
1. Messung	590	-18.4	-17.0	-1.5
2. Messung	248	-20.6	-14.9	-5.7
3. Messung	248	-20.6	-10.2	-10.4
Mittelwert	362 \pm 161	-19.9 \pm 1.2	-14.0 \pm 3.5	-5.8 \pm 4.5

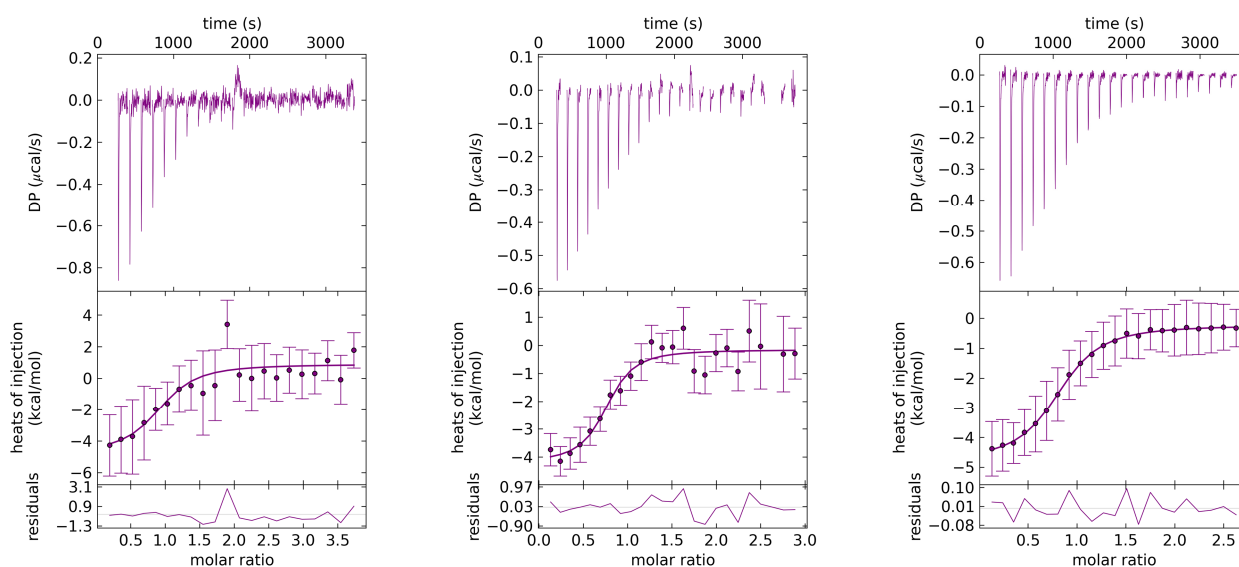


Abbildung 9.9: ITC-Ergebnisse der Verdrängungstitration des Liganden 35 in einem HEPES-Puffer. Zur Verdrängung wurde **21** verwendet, da es eine höhere Affinität zur PKA aufweist. Gezeigt sind die Thermogramme und die Auftragungen der integrierten Wärmesignale gegen das stöchiometrische Verhältnis von Ligand zu Protein.

Tabelle 9.13: Auflistung der thermodynamischen Parameter für die Komplexbildung von 38 mit der PKA. Die Bestimmung erfolgte mithilfe der ITC nach einer Verdrängungstitration von 21 in einen PKA enthaltenen TRIS-Puffer. Das Protein wurde zuvor mit dem zu untersuchenden Liganden 38 gesättigt.

	K_D [μM]	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]
1. Messung	134	-22.1	-2.3	-19.8
2. Messung	228	-20.8	-4.5	-16.3
3. Messung	698	-18.0	-8.8	-9.2
Mittelwert	353 ± 247	-20.3 ± 2.1	-5.2 ± 3.3	-15.1 ± 5.4

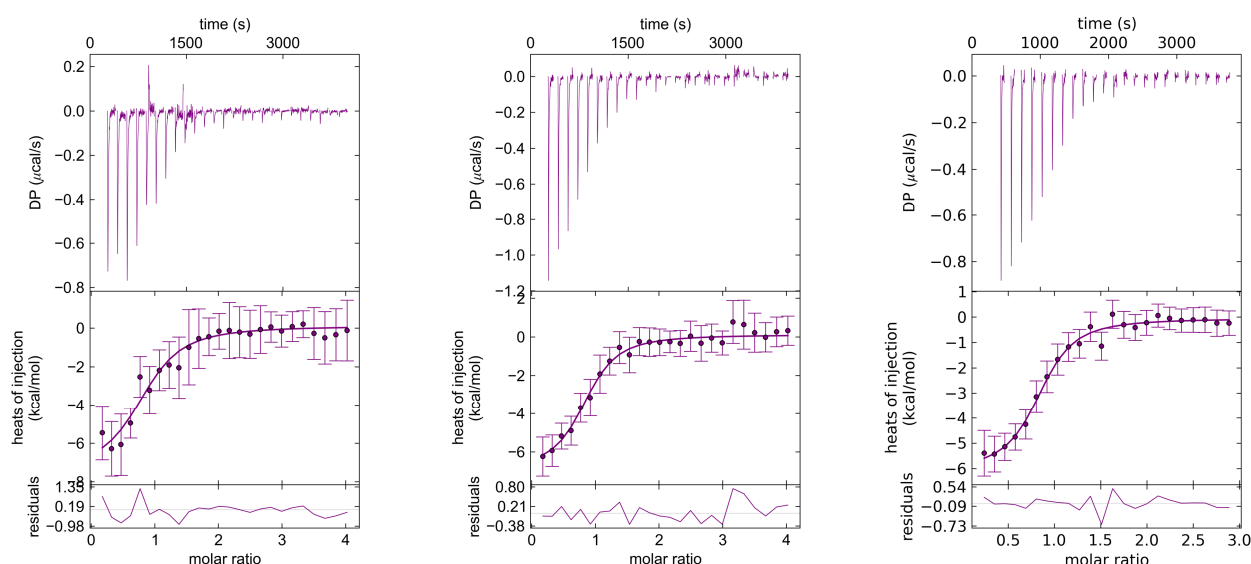


Abbildung 9.10: ITC-Ergebnisse der Verdrängungstitration des Liganden 38 in einem HEPES-Puffer. Zur Verdrängung wurde 21 verwendet, da es eine höhere Affinität zur PKA aufweist. Gezeigt sind die Thermogramme und die Auftragungen der integrierten Wärmesignale gegen das stöchiometrische Verhältnis von Ligand zu Protein.

Tabelle 9.14: Auflistung der thermodynamischen Parameter für die Komplexbildung von 21 mit der PKA. Die Bestimmung erfolgte mithilfe der ITC nach einer Verdrängungstitration von 21 in einen PKA enthaltenen TRIS-Puffer. Das Protein wurde zuvor mit dem zu untersuchenden Liganden 39 gesättigt.

	K_D [μM]	ΔG [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$-T\Delta S$ [kJ/mol]
1. Messung	516	-18.8	-8.5	-10.2
2. Messung	810	-17.6	-9.8	-7.9
3. Messung	477	-19.0	-9.6	-9.3
Mittelwert	601 \pm 148	-18.5 \pm 0.7	-9.3 \pm 0.7	-9.1 \pm 1.2

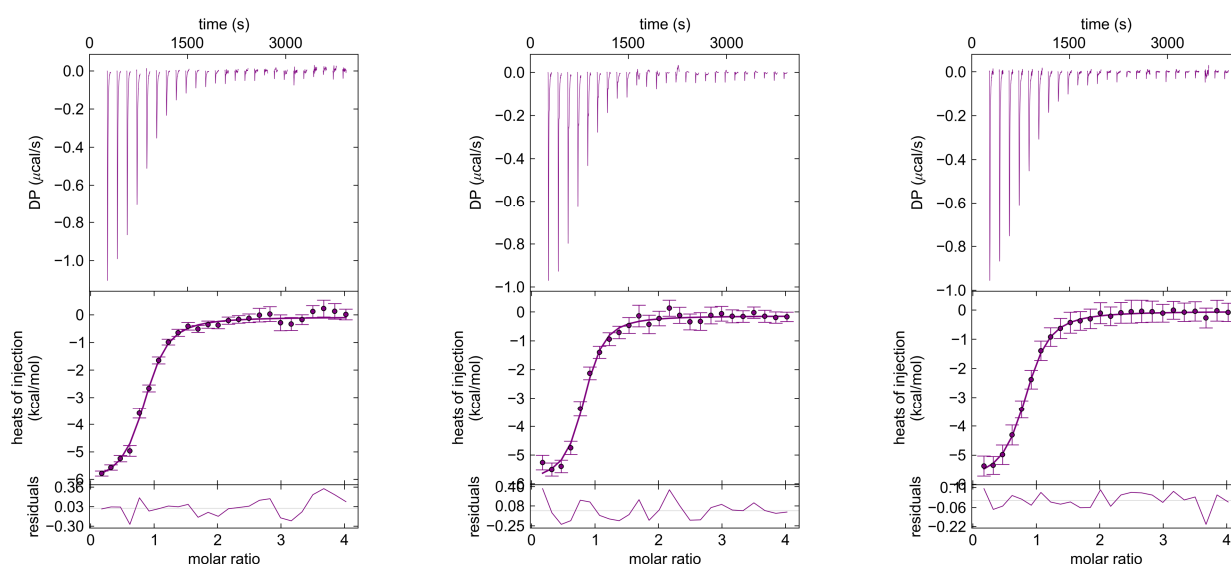


Abbildung 9.11: ITC-Ergebnisse der Verdrängungstitration des Liganden 39 in einem HEPES-Puffer. Zur Verdrängung wurde 21 verwendet, da es eine höhere Affinität zur PKA aufweist. Gezeigt sind die Thermogramme und die Auftragungen der integrierten Wärmesignale gegen das stöchiometrische Verhältnis von Ligand zu Protein.

Literaturverzeichnis

- [1] D. Joseph-McCarthy, A. J. Campbell, G. Kern, D. Moustakas, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014**, 54, 693.
- [2] L. Englert, K. Silber, H. Steuber, S. Brass, B. Over, H.-D. Gerber, A. Heine, W. E. Diederich, G. Klebe, *ChemMedChem* **2010**, 5, 930.
- [3] D. Cronk in *Drug Discovery and Development: Technology and Transition* (Hrsg.: R. G. Hill, H. P. Rang), Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, **2013**, S. 95–117.
- [4] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46, 3.
- [5] E. Freire, *Drug Discovery Today* **2008**, 13, 869.
- [6] C. A. Lipinski, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2000**, 44, 235.
- [7] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin, *Analytical Biochemistry* **1989**, 179, 131.
- [8] A. Schön, E. Freire, *Analytical Biochemistry* **2016**, 513, 1.
- [9] P. W. Atkins, J. de Paula, *Atkins Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2006**.
- [10] M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, *Methods* **1999**, 19, 213.
- [11] R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* **2004**, 24, 1.
- [12] Y. L. Zhang, Z. Y. Zhang, *Analytical Biochemistry* **1998**, 261, 139.
- [13] F. Dullweber, M. T. Stubbs, D. Musil, J. Stürzebecher, G. Klebe, *Journal of Molecular Biology* **2001**, 313, 593.
- [14] S. G. Krimmer, G. Klebe, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2015**, 29, 867.
- [15] J. E. Ladbury, G. Klebe, E. Freire, *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, 9, 23.
- [16] W. B. Turnbull, A. H. Daranas, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 14859.
- [17] J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, *Chemistry & Biology* **1996**, 3, 791.
- [18] Universal Protein Resource Datenbank, Eintrag P25321, **zuletzt geprüft am: 26.02.2020**.
- [19] ExPASy, *LALIGN Server für Sequenzvergleiche*, kann gefunden werden unter https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html, **zuletzt geprüft am: 03.10.2020**.
- [20] D. A. Johnson, P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, M. Madhusudan, S. S. Taylor, *Chemical Reviews* **2001**, 101, 2243.

- [21]R. Santos, O. Ursu, A. Gaulton, A. P. Bento, R. S. Donadi, C. G. Bologa, A. Karlsson, B. Al-Lazikani, A. Hersey, T. I. Oprea et al., *Nature Reviews Drug Discovery* **2017**, 16, 19.
- [22]L. K. Chico, L. J. van Eldik, D. M. Watterson, *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8, 892.
- [23]Y. S. Cho, Y. G. Park, Y. N. Lee, M. K. Kim, S. Bates, L. Tan, Y. S. Cho-Chung, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, 835.
- [24]A. Levitzki, *Trends in Biochemical Sciences* **1988**, 13, 298.
- [25]P. L. Yeagle, A. D. Albert, *Biochemistry* **2003**, 42, 1365.
- [26]F. W. Herberg, S. S. Taylor, W. R. Dostmann, *Biochemistry* **1996**, 35, 2934.
- [27]C. M. Smith, E. Radzio-Andzelm, Madhusudan, P. Akamine, S. S. Taylor, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1999**, 71, 313.
- [28]K. L. Dodge, S. Khouangsathiene, M. S. Kapiloff, R. Mouton, E. V. Hill, M. D. Houslay, L. K. Langeberg, J. D. Scott, *The EMBO Journal* **2001**, 20, 1921.
- [29]K. Sjøberg, L. V. Moen, B. S. Skålhegg, J. K. Laerdahl, *PLOS ONE* **2017**, 12.
- [30]W. Yonemoto, S. M. Garrod, S. M. Bell, S. S. Taylor, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 18626.
- [31]G. Klebe, *Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [32]N. Siraj, B. El-Zahab, S. Hamdan, T. E. Karam, L. H. Haber, M. Li, S. O. Fakayode, S. Das, B. Valle, R. M. Strongin et al., *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 170.
- [33]D. Semwogerere, Weeks D. (Hrsg.) *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering: Kapitel über konfokale Mikroskopie*, CRC Press, **2008**.
- [34]J. W. Lichtman, J.-A. Conchello, *Nature Methods* **2005**, 2, 910.
- [35]Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, *Z'-LYTE(TM) Kinase Assay Kit - Ser/Thr 1 Peptide Protocol*, kann gefunden werden unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PV3174?SID=srch-srp-PV3174#/PV3174?SID=srch-srp-PV3174>, **zuletzt geprüft am: 10.04.2020**.
- [36]E. C. Hulme, M. A. Trevethick, *British Journal of Pharmacology* **2010**, 161, 1219.
- [37]C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochemical Pharmacology* **1973**, 22, 3099.
- [38]H. Lineweaver, D. Burk, *Journal of the American Chemical Society* **1934**, 56, 658.
- [39]A. McPherson, J. A. Gavira, *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications* **2014**, 70, 2.

-
- [40]E. H. Snell, H. D. Bellamy, G. E.O. Borgstahl in *Methods in Enzymology* (Hrsg.: C. W. Carter, R. M. Sweet), Elsevier Academic Press, Amsterdam, Oxford, **2003**, S. 268–288.
- [41]B. Rupp, *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications* **2015**, 71, 247.
- [42]N. E. Chayen, *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **1998**, 54, 8.
- [43]M. Gerlach, U. Mueller, M. S. Weiss, *Journal of Large-Scale Research Facilities* **2016**, 2.
- [44]K. Cowtan in *Encyclopedia of life sciences*, Wiley, Chichester, **2005**.
- [45]G. Taylor, *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2003**, 59, 1881.
- [46]M. Oebbeke, C. Siefker, B. Wagner, A. Heine, G. Klebe, *Angewandte Chemie Internationale Ausgabe* **2020**, 60, 252.
- [47]G. M. Keseru, G. M. Makara, *Drug Discovery Today* **2006**, 11, 741.
- [48]G. A. Patani, E. J. LaVoie, *Chemical Reviews* **1996**, 96, 3147.
- [49]L. M. Lima, E. J. Barreiro, *Current Medicinal Chemistry* **2005**, 12, 23.
- [50]A. Burger, *Progress in Drug Research* **1991**, 37, 287.
- [51]P. H. Olesen, *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2001**, 4, 471.
- [52]L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, A. D. Andricopulo, *Molecules* **2015**, 20, 13384.
- [53]Z. Zhou, A. K. Felts, R. A. Friesner, R. M. Levy, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, 47, 1599.
- [54]S. K. Burley, H. M. Berman, C. Christie, J. M. Duarte, Z. Feng, J. Westbrook, J. Young, C. Zardecki, *Protein Science* **2018**, 27, 316.
- [55]N. S. Garton, M. D. Barker, R. P. Davis, C. Douault, E. Hooper-Greenhill, E. Jones, H. D. Lewis, J. Liddle, D. Lugo, S. McCleary et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 26, 4606.
- [56]M. J. Waring, J. Arrowsmith, A. R. Leach, P. D. Leeson, S. Mandrell, R. M. Owen, G. Pairaudeau, W. D. Pennie, S. D. Pickett, J. Wang et al., *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, 14, 475.
- [57]L. D. Pennington, B. M. Aquila, Y. Choi, R. A. Valiulin, I. Muegge, *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, 63, 8956.
- [58]D. A. Erlanson, I. J. P. de Esch, W. Jahnke, C. N. Johnson, P. N. Mortenson, *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, 63, 4430.
- [59]G. L. Grunewald, M. R. Seim, J. Lu, M. Makboul, K. R. Criscione, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 2939.

- [60]B. O. Brandsdal, A. O. Smalås, J. Aqvist, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2006**, 64, 740.
- [61]Y.-I. Lin, C. Lim, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 2602.
- [62]R. Gaspari, C. Rechlin, A. Heine, G. Bottegoni, W. Rocchia, D. Schwarz, J. Bomke, H.-D. Gerber, G. Klebe, A. Cavalli, *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59, 4245.
- [63]M. J. S. Phipps, T. Fox, C. S. Tautermann, C.-K. Skylaris, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2017**, 13, 1837.
- [64]C. N. Cavasotto, *Methods in Molecular Biology* **2020**, 2114, 257.
- [65]C. N. Cavasotto, N. S. Adler, M. G. Aucar, *Frontiers in Chemistry* **2018**, 6, 188.
- [66]J. Schiebel, R. Gaspari, A. Sandner, K. Ngo, H.-D. Gerber, A. Cavalli, A. Ostermann, A. Heine, G. Klebe, *Angewandte Chemie Internationale Ausgabe* **2017**, 56, 4887.
- [67]D. A. Erlanson, *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, 17, 643.
- [68]R. Urich, G. Wishart, M. Kiczun, A. Richters, N. Tidten-Luksch, D. Rauh, B. Sherborne, P. G. Wyatt, R. Brenk, *ACS Chemical Biology* **2013**, 8, 1044.
- [69]Y. Hu, R. Kunitomo, J. Bajorath, *Chemical Biology & Drug Design* **2017**, 89, 834.
- [70]J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nature Reviews Cancer* **2009**, 9, 28.
- [71]P. Mukherjee, J. Bentzien, T. Bosanac, W. Mao, M. Burke, I. Muegge, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2017**, 57, 2152.
- [72]Z. Fang, C. Grütter, D. Rauh, *ACS Chemical Biology* **2013**, 8, 58.
- [73]R. E. Turnham, J. D. Scott, *Gene* **2016**, 577, 101.
- [74]S. S. Taylor, P. Zhang, J. M. Steichen, M. M. Keshwani, A. P. Kornev, *Biochimica et Biophysica Acta* **2013**, 1834, 1271.
- [75]P. Czodrowski, G. Hölzemann, G. Barnickel, H. Greiner, D. Musil, *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58, 457.
- [76]D. R. Lide (Hrsg.) *CRC handbook of chemistry and physics*, CRC Press, Boca Raton, **2004**.
- [77]M. A. Fabian, W. H. Biggs, D. K. Treiber, C. E. Atteridge, M. D. Azimioara, M. G. Benedetti, T. A. Carter, P. Ciceri, P. T. Edeen, M. Floyd et al., *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 329.
- [78]B. M. Klebl, G. Müller, *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2005**, 9, 975.
- [79]T. J. Murray, S. C. Zimmerman, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, 4010.

- [80] M. Neeb, P. Czodrowski, A. Heine, L. J. Barandun, C. Hohn, F. Diederich, G. Klebe, *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 5554.
- [81] Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie. The MX beamlines BL14.1-3 at BESSY II, *Journal of Large-Scale Research Facilities* **2016**, 2, A47.
- [82] A. Burkhardt, T. Pakendorf, B. Reime, J. Meyer, P. Fischer, N. Stübe, S. Panneerselvam, O. Lorbeer, K. Stachnik, M. Warmer et al., *The European Physical Journal Plus* **2016**, 131.
- [83] A. Meents, B. Reime, N. Stuebe, P. Fischer, M. Warmer, D. Goeries, J. Roevers, J. Meyer, J. Fischer, A. Burkhardt et al. in *SPIE Proceedings* (Hrsg.: B. Lai), SPIE, **2013**, 8851.
- [84] K. Y. Tam, K. Takács-Novák, *Analytica Chimica Acta* **2001**, 434, 157.
- [85] K. Box, C. Bevan, J. Comer, A. Hill, R. Allen, D. Reynolds, *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 883.
- [86] Universität Hamburg, *Proteins.plus-Server*, kann gefunden werden unter <https://proteins.plus>,
zuletzt geprüft am: 19.12.2020.
- [87] B. Wienen-Schmidt, M. Oebbeke, K. Ngo, A. Heine, G. Klebe, *ChemMedChem* **2021**, 16, 292.
- [88] D. A. Erlanson, S. W. Fesik, R. E. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, 15, 605.
- [89] Z. Chilingaryan, Z. Yin, A. J. Oakley, *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, 13, 12857.
- [90] P. Kuhn, K. Wilson, M. G. Patch, R. C. Stevens, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, 6, 704.
- [91] G. Scapin, *Current Pharmaceutical Design* **2006**, 12, 2087.
- [92] X. Yin, A. Scalia, L. Leroy, C. M. Cuttitta, G. M. Polizzo, D. L. Ericson, C. G. Roessler, O. Campos, M. Y. Ma, R. Agarwal et al., *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2014**, 70, 1177.
- [93] J. Schiebel, N. Radeva, S. G. Krimmer, X. Wang, M. Stieler, F. R. Ehrmann, K. Fu, A. Metz, F. U. Huschmann, M. S. Weiss et al., *ACS Chemical Biology* **2016**, 11, 1693.
- [94] C. F. Wong, *Biochimica et Biophysica Acta* **2008**, 1784, 244.
- [95] Z. Huang, C. F. Wong, *Journal of Computational Chemistry* **2009**, 30, 631.
- [96] A. P. Kornev, S. S. Taylor, *Trends in Biochemical Sciences* **2015**, 40, 628.
- [97] S. S. Taylor, A. P. Kornev, *Trends in Biochemical Sciences* **2011**, 36, 65.
- [98] D. E. Danley, *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2006**, 62, 569.
- [99] A. M. Hassell, G. An, R. K. Bledsoe, J. M. Bynum, H. L. Carter, S.-J. J. Deng, R. T. Gampe, T. E. Grisard, K. P. Madauss, R. T. Nolte et al., *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2007**, 63, 72.
- [100] G. Klebe, *Drug Discovery Today* **2006**, 11, 580.

- [101] L. Stewart, R. Clark, C. Behnke, *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 187.
- [102] H. Steuber, M. Zentgraf, C. Gerlach, C. A. Sottriffer, A. Heine, G. Klebe, *Journal of Molecular Biology* **2006**, 363, 174.
- [103] D. Rauh, G. Klebe, M. T. Stubbs, *Journal of Molecular Biology* **2004**, 335, 1325.
- [104] D. Rauh, G. Klebe, J. Stürzebecher, M. T. Stubbs, *Journal of Molecular Biology* **2003**, 330, 761.
- [105] X. Zhu, J. L. Kim, J. R. Newcomb, P. E. Rose, D. R. Stover, L. M. Toledo, H. Zhao, K. A. Morgenstern, *Structure* **1999**, 7, 651.
- [106] N. Hiller, K. Fritz-Wolf, M. Deponte, W. Wende, H. Zimmermann, K. Becker, *Protein Science* **2006**, 15, 281.
- [107] F. R. Ehrmann, J. Stojko, A. Metz, F. Debaene, L. J. Barandun, A. Heine, F. Diederich, S. Cianférani, K. Reuter, G. Klebe, *PLOS ONE* **2017**, 12, e0175723.
- [108] J. Müller, R. A. Kirschner, A. Geyer, G. Klebe, *ACS Omega* **2019**, 4, 775.
- [109] B. Wienen-Schmidt, H. R. A. Jonker, T. Wulsdorf, H.-D. Gerber, K. Saxena, D. Kudlinzki, S. Sreeramulu, G. Parigi, C. Luchinat, A. Heine et al., *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 61, 5922.
- [110] B. Wienen-Schmidt, T. Wulsdorf, H. R. A. Jonker, K. Saxena, D. Kudlinzki, V. Linhard, S. Sreeramulu, A. Heine, H. Schwalbe, G. Klebe, *ChemMedChem* **2018**, 13, 1988.
- [111] K. Ngo, C. Collins-Kautz, S. Gerstenecker, B. Wagner, A. Heine, G. Klebe, *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, 63, 3274.
- [112] B. Wienen-Schmidt, D. Schmidt, H.-D. Gerber, A. Heine, H. Gohlke, G. Klebe, *ACS Chemical Biology* **2019**, 14, 2585.
- [113] *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.5.0.3 Schrödinger, LLC.
- [114] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *Journal of Computational Chemistry* **2004**, 25, 1605.
- [115] A. D. McLachlan, *Acta Crystallographica Section A* **1982**, 38, 871.
- [116] A. Martin, C. Porter, *ProFitV3.3*, kann gefunden werden unter <http://www.bioinf.org.uk/software/profit/>, zuletzt geprüft am: 01.07.2020.
- [117] M. Oebbeke, *Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg* **2017**.
- [118] B. Wienen-Schmidt, *Dissertation, Philipps-Universität Marburg* **2016**.
- [119] R. N. Goldberg, N. Kishore, R. M. Lennen, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **2002**, 31, 231.

-
- [120] E. Krissinel, K. Henrick, *Journal of Molecular Biology* **2007**, 372, 774.
- [121] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2010**, 66, 486.
- [122] L. O. Haustedt, C. Mang, K. Siems, H. Schiewe, *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2006**, 9, 445.
- [123] C. Mang, S. Jakupovic, S. Schunk, H.-D. Ambrosi, O. Schwarz, J. Jakupovic, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2006**, 8, 268.
- [124] J. Saupe, O. Kunz, L. O. Haustedt, S. Jakupovic, C. Mang, *Chemistry* **2017**, 23, 11784.
- [125] A. Nören-Müller, I. Reis-Corrêa, H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. J. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 10606.
- [126] H. Köster, *Dissertation, Philipps-Universität Marburg* **2012**.
- [127] J. Behnen, H. Köster, G. Neudert, T. Craan, A. Heine, G. Klebe, *ChemMedChem* **2012**, 7, 248.
- [128] T. J. Mooibroek, P. Gamez, *CrystEngComm* **2013**, 15, 1802.
- [129] S. M. Huber, J. D. Scanlon, E. Jimenez-Izal, J. M. Ugalde, I. Infante, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2013**, 15, 10350.
- [130] R. A. Pascal, D. M. Ho, *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, 4707.
- [131] S. Kortagere, S. Ekins, W. J. Welsh, *Journal of molecular graphics & modelling* **2008**, 27, 170.
- [132] D. Kudlinzki, V. L. Linhard, K. Saxena, S. Sreeramulu, S. Gande, U. Schieborr, M. Dreyer, H. Schwalbe, *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications* **2015**, 71, 1088.
- [133] F. W. Studier, *Protein Expression and Purification* **2005**, 41, 207.
- [134] W. Kabsch, *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2010**, 66, 125.
- [135] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *Journal of Applied Crystallography* **2007**, 40, 658.
- [136] D. Liebschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkóczi, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L. W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy et al., *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2019**, 75, 861.
- [137] P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. Mustyakimov, T. C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P. H. Zwart, P. D. Adams, *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2012**, 68, 352.

- [138] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *Journal of Applied Crystallography* **1993**, 26, 283.
- [139] G. J. Kleywegt, *MOLEMAN. Unpublished Program; Uppsala University: Uppsala, Sweden*.
- [140] G. J. Kleywegt, J.-Y. Zou, M. Kjeldgaard, T. A. Jones in *International Tables for Crystallography* (Hrsg.: H. Fuess), Springer Netherlands, Amsterdam, **2006**, S. 353–356.
- [141] I. J. Bruno, J. C. Cole, M. Kessler, J. Luo, W. D. S. Motherwell, L. H. Purkis, B. R. Smith, R. Taylor, R. I. Cooper, S. E. Harris et al., *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **2004**, 44, 2133.
- [142] S. J. Cottrell, T. S. G. Olsson, R. Taylor, J. C. Cole, J. W. Liebeschuetz, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2012**, 52, 956.
- [143] O. S. Smart, T.O. Womack, A. Sharff, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, C. Vonrhein, G. Bricogne, Cambridge, United Kingdom, Global Phasing Ltd., *Grade Web Server*, kann gefunden werden unter <http://www.globalphasing.com>, **zuletzt geprüft am: 18.08.2020**.
- [144] Bernhard Rupp, *Matthews Probability Calculator*, kann gefunden werden unter <http://www.ruppweb.org/mattprob/default.html>, **zuletzt geprüft am: 20.03.2018**.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Prinzip des Fragment-basierten Wirkstoffdesigns	2
Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines isothermen Titrationskalorimeter	4
Abbildung 1.3: Thermogramm der Rohdaten aus einer ITC-Messung	5
Abbildung 1.4: Verteilung von Wirkstoffen	8
Abbildung 1.5: Struktur der CHO PKA im Komplex mit ATP und PKI	10
Abbildung 1.6: Mechanismus der PKA zur Übertragung von Phosphat	11
Abbildung 1.7: Linseneinheit für die konfokale Mikroskopie	13
Abbildung 1.8: Phasendiagramm nach Rupp für eine Proteinlösung	17
Abbildung 2.1: Überblick über die verschiedenen Liganden, wie sie an die Scharnierregion der PKA binden 1/3	26
Abbildung 2.2: Überblick über die verschiedenen Liganden, wie sie an die Scharnierregion der PKA binden 2/3	28
Abbildung 2.3: Überblick über die verschiedenen Liganden, wie sie an die Scharnierregion der PKA binden 3/3	30
Abbildung 3.1: Soaking und Kokristallisation – Überblick der verwendeten Liganden	50
Abbildung 3.2: Kristallstrukturen von 20 - gesoakt und kokristallisiert	52
Abbildung 3.3: Kristallstrukturen von 21 - gesoakt und kokristallisiert	53
Abbildung 3.4: Kristallstrukturen von 22 - gesoakt und kokristallisiert	54
Abbildung 3.5: Kristallstrukturen von 23 - gesoakt und kokristallisiert	55
Abbildung 3.6: Kristallstrukturen von 24 - gesoakt und kokristallisiert	56
Abbildung 3.7: Kristallstrukturen von 25 - gesoakt und kokristallisiert	57
Abbildung 3.8: Kristallstrukturen von 26 - gesoakt und kokristallisiert	58
Abbildung 3.9: Kristallstrukturen von 27 - gesoakt und kokristallisiert	59
Abbildung 3.10: Kristallstrukturen von 28 in der S1-Tasche von Trypsin	63
Abbildung 3.11: Lokale Packung von Trypsinmolekülen um 28 im orthorhombisch kokristallisierten und trigonalen Komplex aus dem Soaking	64
Abbildung 4.1: Prinzip der Verdrängung der Fluoreszenz aus einem Proteinkristall	70
Abbildung 4.2: Prinzip des Verdrängungsexperimentes schematisch dargestellt	72

Abbildung 4.3: Emissionsspektren – Soaking mit 21 und Verdrängung mit 29	73
Abbildung 4.4: Visualisierung der Fluoreszenz zweier mit 21 versetzten Kristalle	74
Abbildung 4.5: Fluoreszierender PKA Kristall in verschiedenen Ebenen	75
Abbildung 4.6: Emissionsspektrum eines Kristalls mit dem Testliganden 29	76
Abbildung 4.7: Aktive Tasche der PKA mit Aminofasudil in der Bindetasche	77
Abbildung 4.8: PKA mit 29 in der Bindetasche nach dem Verdrängen von 21	78
Abbildung 4.9: Emissionsspektren eines Kristalls mit 21 und 30	79
Abbildung 5.1: Übersicht Fragmentserie	86
Abbildung 5.2: ITC – Thermogramm und Auswertung einer Titrationskurve	88
Abbildung 5.3: Veranschaulichung der mittels ITC bestimmten thermodynamischen Parameter	89
Abbildung 5.4: Bindungsmotiv von 33 an der PKA-Scharnierregion	90
Abbildung 5.5: Zweites Bindungsmotiv von 33 an der PKA	91
Abbildung 5.6: Bindungsmotiv von 36 an der PKA-Scharnierregion	92
Abbildung 5.7: Bindungsmotiv von 27 an der PKA-Scharnierregion	93
Abbildung 5.8: Bindungsmotiv von 39 an der PKA-Scharnierregion	94
Abbildung 5.9: ITC – Protonierungseffekt von 21	97
Abbildung 5.10: Fragmentserie – Orientierungen der Liganden an der Scharnierregion.	99
Abbildung 5.11: Strukturformeln der in vorheriger Abbildung nicht gezeigten Reste	100
Abbildung 5.12: Überlagerung der Kokristallstrukturen von 34 und 35	102
Abbildung 5.13: Überlagerung der gesamten Strukturen dieser Serie	103
Abbildung 5.14: Überlagerung der gesamten Strukturen der Serie mit Fokus auf die Orientierung des Peptids PKI	104
Abbildung 6.1: Auftragung zur Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	120
Abbildung 6.2: LINEWEAVER-BURK-Auftragung zur Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante	122
Abbildung 6.3: Bilder der erhaltenen Kristallformen	125
Abbildung 6.4: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 46 (1/2)	126
Abbildung 6.5: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 46 (2/2)	127
Abbildung 7.1: Darstellung einiger Verbindungen dieser Serie	134
Abbildung 7.2: Strukturformeln der stereoselektiv hergestellten Verbindungen 67 und 68	135
Abbildung 7.3: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 67s	137

Abbildung 7.4: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 68s.....	138
Abbildung 7.5: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 67k.....	139
Abbildung 7.6: Darstellung der aktiven Tasche der Struktur 68k.....	141
Abbildung 7.7: Darstellung der aktiven Tasche der PKA mit 68 (72s).....	143
Abbildung 7.8: Darstellung der aktiven Tasche der humanen PKA mit 66	145
Abbildung 7.9: Vergleich der Strukturen aus vorherigen Arbeiten mit Strukturen, die in dieser Arbeit erhalten wurden.....	146
Abbildung 9.1: Dichtekarten der untersuchten Liganden (1/6)	176
Abbildung 9.2: Dichtekarten der untersuchten Liganden (2/6)	177
Abbildung 9.3: Dichtekarten der untersuchten Liganden (3/6)	178
Abbildung 9.4: Dichtekarten der untersuchten Liganden (4/6)	179
Abbildung 9.5: Dichtekarten der untersuchten Liganden (5/6)	180
Abbildung 9.6: Dichtekarten der untersuchten Liganden (6/6)	181
Abbildung 9.7: ITC-Ergebnisse - Ligand 21.....	183
Abbildung 9.8: ITC-Ergebnisse - Ligand 33.....	184
Abbildung 9.9: ITC-Ergebnisse - Ligand 35.....	185
Abbildung 9.10: ITC-Ergebnisse - Ligand 38.....	186
Abbildung 9.11: ITC-Ergebnisse der Verdrängungstitration des Liganden 39 in einem HEPES-Puffer	187

Danksagung

In meinem Masterstudium durfte ich in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe meine ersten Erfahrungen auf dem Gebiet der Wirkstoffentwicklung machen. Das überzeugte mich davon, auch in Zukunft in diesem Bereich forschen und arbeiten zu wollen. Daher danke ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Die vielen persönlichen Gespräche haben mir fachliche, sowie berufs- und zukunftsorientierte Hilfestellungen gegeben. Außerdem war die Arbeitsatmosphäre sehr angenehm, in welcher ich viel wissenschaftlichen Freiraum erfuhr, aber mir zugleich wertvolle Tipps für ein effizientes Erreichen der Ziele gegeben wurden. Dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Prof. Dr. Andreas Heine möchte ich für die vielen Stunden persönlicher Gespräche danken, in denen ich sehr viel über die Proteinkristallographie gelernt habe. Darüber hinaus konnte ich von ihm jederzeit Hilfestellungen bei verschiedenen Problemen erhalten.

Prof. Dr. Klaus Reuter danke ich für die netten und hilfreichen Unterhaltungen, die oftmals S1-spezifische Fragen oder das von ihm organisierte Pharmazie-Praktikum betrafen. Für die Organisation des Praktikums möchte ich an dieser Stelle auch Dr. Armin Reichenberg danken.

Für die Unterstützung während der Messungen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop danke ich Herrn Prof. Dr. Cornelius Krasel. Die zahlreichen Treffen waren von vielen hilfreichen Tipps und netten Unterhaltungen geprägt.

Ein großer Dank geht an meine Vorgänger der PKA-Projekte. Besonders danke ich Dr. Barbara Wienen-Schmidt, die mich in meiner Zeit als Masterstudent in die Arbeitsgruppe integriert und in viele Arbeitsmethoden eingeführt hat. Die Vorarbeit für zwei Teil-Projekte waren ebenfalls sehr hilfreich,

um die gestellten Fragestellungen abschließend klären zu können. Weiterhin danke ich Dr. Christof Siefker und Dr. Janis Müller, die mir diverse Tipps vor allem zu kristallographischen Fragestellungen gegeben haben.

Die verlässliche Laborarbeit ist ohne die Organisation, die oftmals im Hintergrund abläuft, nicht möglich. Dafür möchte ich Lydia Hartleben, Christian Sohn und Stefanie Dörr danken, die viele organisatorische Aufgaben übernommen haben. Christian Sohn danke ich darüber hinaus für die Betreuung am Röntgengerät, sowie der Wartung weiterer Laborgeräte. Stefanie Dörr danke ich besonders für ihre Unterstützung im Labor.

Eine sehr gute Arbeitsatmosphäre ist nur möglich, wenn auch die Kollegen im eigenen Büro eine solche Stimmung verbreiten. Daher bin ich sehr glücklich darüber, zusammen mit Stefanie Dörr, Marina Gárdonyi, Lea-Sophie Hubert und Maurice Sebastiani in einem Büro gewesen zu sein. Die unterhaltsamen, aber auch fachlich geprägten Gespräche haben die Atmosphäre sehr aufgelockert. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Lea-Sophie Hubert, die das Korrekturlesen meiner gesamten Arbeit übernommen hat. Weiterhin bedanke ich mich bei den Leuten, die nur kurzzeitig mit mir in diesem Büro gearbeitet haben: Christina Behrens, Dr. Nedyalka Radeva, Dr. Janis Müller, Moritz Ruf und Anna Trodler.

Hans-Dieter Gerber möchte ich einen sehr großen Dank aussprechen, da ich seine Offenheit und Hilfsbereitschaft sehr zu schätzen weiß. Die zahlreichen fachlichen Gespräche haben mir sehr weitergeholfen. Vor allem bei chemischen Fragen war er mein erster Ansprechpartner. Auch die persönlichen Gespräche und die Eindrücke aus seinen Nordamerika-Reisen waren sehr beeindruckend.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die offene und hilfsbereite Einstellung jedes Einzelnen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Steffen Glöckner, Dr. Khang Ngo und Anna Sandner, die allesamt ITC-Messungen auf ihren jeweiligen Projekten durchgeführt haben. Für den

wissenschaftlichen Austausch und der Weitergabe von hilfreichen Tipps bin ich ihnen sehr dankbar. Weiterhin danke ich Dr. Andreas Nguyen, Dzung Nguyen, Dr. Mohammed Jud Badran, Dr. Alexander Metz, Dr. Francesca Magari, William Scanlan, Simon Huber, Thuy van Lam und vielen weiteren Kollegen und Freunden für eine wundervolle Zeit in Marburg.

Björn Wagner danke ich für die Messungen zur Bestimmung der pK_a -Werte einiger chemischer Verbindungen.

Meinen Vertiefungsstudenten Jana Kohlmann, Felix Stephan und Simon Völpel danke ich für ihre Unterstützung im Labor.

Dr. Jan Wollenhaupt möchte ich für die Aufnahmen einiger Kristallstruktur-Datensätze am BESSY II danken, welche während der Corona-Zeit aufgrund der geltenden Bestimmungen nicht durch uns persönlich durchgeführt werden konnten.

Weiterhin danke ich Crystals First für die Kooperation und Unterstützung in einem Teil-Projekt.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich nicht nur während der Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt hat. Ich bin froh, einen solch guten Rückhalt zu haben. Ganz besonders danke ich meiner Freundin Theresa Koch, die mir viel Kraft gibt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Fragment-basierte Leitstruktursuche am Beispiel der Proteinkinase A“ gemäß §10 der Promotionsordnung vom 22.04.2009 weder in der jetzigen noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Hochschule eingereicht habe. Die Dissertation habe ich selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und mich keiner außer den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln bedient. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Marburg, den 21.01.2021

(Matthias Oebbeke)